

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/31140 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/10, (74) 代理人: 弁理士 小栗昌平, 外(OGURI, Shohei et al.)
C12P 21/08, C07K 16/00, A01K 67/00, A61K 39/395,
C12N 9/00, 15/52, G01N 33/53 ; 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク
森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08804 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 5 日 (05.10.2001) DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
(25) 国際出願の言語: 日本語 LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
(26) 国際公開の言語: 日本語 TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (30) 優先権データ: 特願2000-308526 2000 年 10 月 6 日 (06.10.2000) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
(71) 出願人: 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO
KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田
区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP). LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者: 神田 豊 (KANDA, Yutaka). 佐藤光
男 (SATO, Mitsuo). 中村和靖 (NAKAMURA,
Kazuyasu). 内田和久 (UCHIDA, Kazuhisa). 新川豊
英 (SHINKAWA, Toyohide). 山根尚子 (YAMANE,
Naoko). 保坂絵美 (HOSAKA, Emi). 山野和也 (YA-
MANO, Kazuya). 山崎基生 (YAMASAKI, Motoo). 花
井陳雄 (HANAI, Nobuo); 〒194-0023 東京都町田市旭
町三丁目6番6号 協和 酵工業株式会社 東京研究
所内 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

WO 02/31140 A1

(54) Title: CELLS PRODUCING ANTIBODY COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: 抗体組成物を生産する細胞

(57) Abstract: Cells to be used in producing antibody compositions, for example, an antibody having a high antibody-dependent cellular cytotoxic activity which is useful in various diseases, an antibody fragment or a fused protein having the Fc domain of the antibody; a process for producing an antibody composition by using these cells; antibody compositions; and uses thereof. In the above-described antibody compositions, the ratio of sugar chains, which are free from fucose bonded to N-acetylglucosamine at the sugar chain reducing end, to the total N-glycoside linkage complex sugar chains bonded to the Fc domain amounts to 20% or more. Moreover, novel GDP-mannose 4,6-dehydrogenase, GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase 4-reductase, GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase, alpha-1,6-fucosyltransferase and DNAs encoding the same are provided.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

本発明は、種々の疾患に有用な抗体依存性細胞障害活性の高い、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質等の抗体組成物の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、およびそれらの用途に関する。該抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であるものである。また新規なGDP-マンノース 4,6-デヒドロゲナーゼ、GDP-ケト-6-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ 4-レダクターゼ、GDP-ベータ-L-フコース ピロフォスソリラーゼ、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ及びこれをコードするDNAをも提供する。

明 細 書

抗体組成物を生産する細胞

技術分野

本発明は、種々の疾患に有用な抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質などの抗体分子の製造に用いる細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、およびその用途に関する。

背景技術

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、CDR と表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V 領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C 領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト抗体の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR と置換した抗体である。

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒト IgG クラスの抗体が主として利用されている [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有し

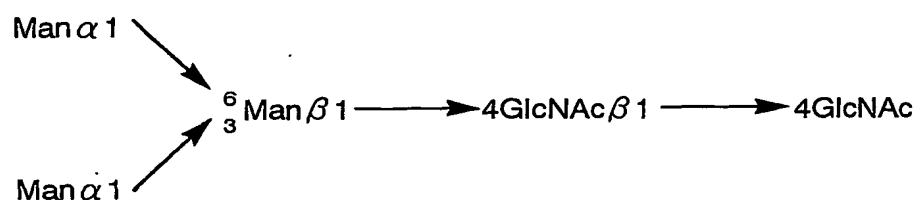
ていることが報告されている [ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体の ADCC 活性及び CDC 活性の発現には、抗体 Fc 領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、Fc γ R と表記する）及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及び C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、C γ 2 ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性 [ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー(Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] の他、C γ 2 ドメインに結合している糖鎖の重要性 [ケミカル・イムノロジー(Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] が示唆されている。

糖鎖に関しては、ボイド (Boyd) らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) 或いはマウスミエローマ NS0 細胞 (NS0 細胞) で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H (ヒト IgG1 サブクラス) を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の ADCC 活性、CDC 活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することで CDC 活性のみが影響を受け、約 50%程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した [モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)]。また、ライフリー(Lifely)らは、CHO 細胞、NS0 細胞或いはラットミエローマ Y0 細胞で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H (ヒト IgG1 サブクラス) の糖鎖の分析及び ADCC 活性を測定した結果、Y0 細胞由来の CAMPATH-1H が最も高い ADCC 活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc と表記する）が重要であることを示唆した [グリコバイオロジー(Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342]。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示

している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖（N-グリコシド結合糖鎖）とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖（O-グリコシル結合糖鎖）の2種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、様々な構造を有しているが〔生物化学実験法 23-糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年）〕、いずれの場合も以下の構造式（I）に示す基本となる共通のコア構造を有することが知られている。



構造式 (I)

アスパラギンと結合する糖鎖の末端が還元末端、反対側が非還元末端と呼ばれている。N-グリコシド結合糖鎖には、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあることが知られている。

抗体 IgG 分子の Fc 領域には、2 個所の N-グリコシド型の糖鎖結合部位が存在しており、血清中の IgG では、通常、この部位に、シアル酸やバイセクティングの N-アセチルグルコサミンの付加の程度が少ない複数本の枝を持つコンプレックス型糖鎖が結合している。このコンプレックス型糖鎖の非還元末端でのガラクトースの付加および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られている[バイオケミストリー(Biochemistry), 36, 130, 1997]。

このような糖鎖の構造は、糖鎖遺伝子、すなわち、糖鎖を合成する糖転移酵素と糖鎖を分解する糖分解酵素の遺伝子によって規定されていると考えられている。

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖タンパク質は、小胞体（以下、ERと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ER内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-Dolとも表記する）と呼ばれる α -イソブレン単位を20個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸にN-アセチルグルコサミンが転移されGlcNAc-P-P-Dolとなり、続いてもう1個GlcNAcが転移されGlcNAc-GlcNAc-P-P-Dolとなる。次いで、マンノース（以下、Manとも表記する）が5個転移され $(\text{Man})_5-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ に、さらに、Manが4個、グルコース（以下、Glcとも表記する）が3個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(\text{Glc})_3-(\text{Man})_9-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ ができる。この14個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニン配列を持ったポリペプチドへER内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸（P-P-Dol）は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、3個のGlcと1ないし2個のManがER上で除去され、この除去には α -1,2-グルコシダーゼ I、 α -1,3-グルコシダーゼ II および α -1,2-マンノシダーゼが関与することが知られている。

ER上でトリミングを受けた糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加するN-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン1-ホスホジエステル α -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび α -マンノシダーゼ I が存在し、Man 残基を5個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型のN-グリコシド結合糖鎖の最初の外側のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI)、2個のManを除去する α -マンノシダーゼ II、外側から2個目のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII)、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースを付加する α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体ラン

ス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けて N-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

一般的に、医薬への応用が考えられているヒト化抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞を宿主細胞として用い製造されているが、上述したように、抗体のエフェクター機能には糖鎖構造が極めて重要な役割を担っていること、宿主細胞によって発現された糖タンパク質の糖鎖構造に違いが観察されることから、より高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能な宿主細胞の開発が望まれている。

生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、1) 糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤の応用、2) 突然変異体の選択、3) 糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の導入などの方法が試みられている。以下に、それら具体的例を述べる。

糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤としては、N-グリコシド結合糖鎖の前駆体であるコアオリゴ糖形成の最初のステップである GlcNAc-P-P-Dol の形成を選択的に阻害するツニカマイシン、グリコシダーゼ I の阻害剤であるカスタノスペルミンや N-メチル-1-デオキシノジリマイシン、グルコシダーゼ II の阻害剤であるプロモコンヅリトール、マンノシダーゼ I の阻害剤である 1-デオキシノジリマイシンや 1,4-ジオキシ-1,4-イミノ-D-マンニトール、マンノシダーゼ II の阻害剤であるスワンソニンなどが知られている。糖転移酵素の特異的な阻害剤としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) などに対する基質のデオキシ誘導体が知られている[グライコバイオロジーシリーズ 2—糖鎖の細胞における運命 (講談社サンエンティフィック) 永井克孝・箱守仙一郎・木幡陽編 (1993)]。また、1-デオキシノジリマイシンはコンプレックス型糖鎖の合成を抑え、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖の割合を増加させることが知られている。実際に、これら阻害剤を培地に添加することで IgG の糖鎖構造が変化し、抗原結合性などが変化することが報告されている[モレキュラー・イムノロジー(Molecular. Immunol.), 26, 1113 (1989)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の活性に関する突然変異体は、主に、レクチン耐性株として選択され取得されている。例えば、WGA (*T. vulgaris* 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis* 由来の concanavalin A)、RIC (*R. communis* 由

来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris* 由来の leukoagglutinin)、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin)、PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin)などのレクチンを用い、様々な糖鎖構造を有する CHO 細胞変異株がレクチン耐性株として取得されている [ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol.Genet.), 12, 51 (1986)]。

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットの β -ガラクトシド- α -2,6-シアルルトランスフェラーゼを CHO 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13848, 1989]。

また、ヒトの β -ガラクトシド-2- α -フコシルトランスフェラーゼをマウス L 細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース (以下、Fuc と表記する) が付加された H 抗原 (Fuc α 1-2Gal β 1-) の発現が確認されている [サイエンス (Science), 252, 1668, 1991]。さらに、ユマナ (Umana) らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミンの付加が抗体の ADCC 活性に重要であるとの知見に基づき、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnTIII) を発現させた CHO 細胞を作製し親株との比較を行っている。親株の CHO 細胞では GnTIII の発現が観察されておらず [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13370, 1984]、作製した GnTIII 発現 CHO 細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べ 16 倍高い ADCC 活性を有していることを確認している [グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995): W099/54342]。またこの際、ユマナ (Umana) らは、 β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) の遺伝子を導入した CHO 細胞も作製しており、GnTIII または GnTV の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すことを報告している。

発明の開示

このように、生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とはいえないため

試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、真に重要な糖鎖構造の特定には至っていない。従って、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼす糖鎖構造の同定と、そのような糖鎖構造の付加が可能な宿主細胞の開発が医薬開発の上で求められている。

本発明は、抗体分子の糖鎖構造を制御することが可能な、抗体組成物を生産する宿主細胞、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、該製造方法で製造された抗体組成物を提供することを目的とする。

本発明は、以下の (1)~(61) に関する。

(1) N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞。

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、

(1) に記載の CHO 細胞。

(3) 抗体分子のクラスが IgG である、(1) または (2) に記載の CHO 細胞。

(4) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した (1)~(3) のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(5) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、(4) に記載の CHO 細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase);

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(6) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、
(5) に記載の CHO 細胞。

- (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(7) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、
(5) に記載の CHO 細胞。

- (a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(8) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

- (a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(9) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、
(5) に記載の CHO 細胞。

- (a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;
- (c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

(10) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、
(5) に記載の CHO 細胞。

- (a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(11) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(5) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

(12) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(4) に記載の CHO 細胞。

(13) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(14) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(12) に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(15) 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、(4) ～(14)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

(16) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(4) ~ (15)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(17) 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(4) ~ (16)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(18) 抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(17) 記載の CHO 細胞。

(19) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、(18) 記載の CHO 細胞。

(20) (1) ~ (19)のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(21) (20) に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

(22) CHO 細胞が産生する N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物。

(23) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が

α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

(24) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の(a)、(b) 及び (c)からなる群から選ばれる酵素である、(23) 記載の細胞。

- (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
- (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
- (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(25) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(26) GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(27) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

(28) Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

- (a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

(29) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(30) GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(24) に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

(31) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(23) に記載の細胞。

(32) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA；

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(33) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、(31) に記載の細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(34) 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、(23) ~ (33) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

(35) 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、(23) ~ (34) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(36) (23) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の細胞が、下記の (a) ~ (i) からなる群から選ばれる細胞。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

(37) (23) ~ (36) のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

(38) 抗体分子のクラスが IgG である、(37) 記載の細胞。

(39) (37) または (38) 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

(40) 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(39) に記載の方法。

(41) (39) または (40) に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(42) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(43) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、(42) 記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(44) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、(42) または (43) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)；

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase);

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

(45) GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、

(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(46) Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、

(44) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(47) GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、

(44) に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(48) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、(42) または (43) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(49) α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、(48) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(50) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、(42)～(49)のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

(51) (42)～(50)のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

(52) 抗体分子のクラスが IgG である、(51) に記載の方法。

(53) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、(51) または(52)に記載の方法。

(54) (51)～(53)のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

(55) (21)、(22)、(41)または(54)のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(56) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、(55) に記載の医薬。

(57) 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)からなる群から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

- (d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；
- (g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(58) (57) 記載の蛋白質をコードする DNA。

(59) 以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

- (a) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA；
- (b) 配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA；
- (c) 配列番号 65 で表される塩基配列を含む DNA；
- (d) 配列番号 48 で表される塩基配列を含む DNA；
- (e) 配列番号 51 で表される塩基配列を含む DNA。

(60) 以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれるゲノム DNA。

- (a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；
- (b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；
- (c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

(61) (58) ~ (60) のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

本発明の抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞であればいかなる CHO 細胞も包含される。

本発明において、抗体分子とは、抗体の Fc 領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc 領域を含む融合タンパク質などをあげることができる。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得された B 細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域は V 領域として HV または VH とも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH とも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CL とも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺

伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現さ

せたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることにヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスがIgGのヒト抗体が好ましい。

抗体の断片とは、上記抗体のFc領域を含んだ断片を意味する。抗体の断片としては、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

Fc領域を含む融合タンパク質とは、抗体のFc領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどのタンパク質とを融合させた物質を意味する。

本発明において、抗体分子のFc領域に結合する糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、そのN-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトースーN-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、パイセ

クティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型（複合型）をあげることができる。

抗体分子の Fc 領域には、後述する N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ 1 カ所ずつ結合する領域を有しているため、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体に結合する N-グリコシド結合糖鎖としては、前記構造式 (I) で示されるコア構造を有するいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する 2 本の N-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc 領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物（以下、本発明の抗体組成物と称する）とは、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する糖鎖から構成されていてもよい。

本発明において、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全ての N-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、該フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに α 結合していない糖鎖を意味する。具体的には、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖があげられる。

本発明の抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは 20% 以上、より好ましくは 25% 以上、さらに好ましくは 30% 以上、特に好ましくは 40% 以上、最も好ましくは 50% 以上である抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。抗体濃度が低下すれば、それに伴って ADCC 活性が低下するが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖

鎖の割合が20%以上の場合、抗体濃度が低くても高い ADCC 活性を獲得することができる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法 23—糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989）]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー（J. Liq. Chromatogr.）, 6, 1577（1983）]によって分析することによっても決定することができる。

本発明において、チャイニーズハムスター卵巢組織由来の CHO 細胞とは、チャイニーズハムスター（Chinese hamster ; *Cricetulus griseus*）の卵巢組織から樹立された株化細胞であればいかなる細胞も包含される。その具体的な例としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945（1958）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275（1968）、Genetics, 55, 513（1968）、Chromosoma, 41, 129（1973）、Methods in Cell Science, 18, 115（1996）、Radiation Research, 148, 260（1997）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216（1980）、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275（1968）、Cell, 6, 121（1975）、Molecular Cell Genetics, Appendix I,II（p883-900）等の文献に記載されている CHO 細胞をあげることができる。また、ATCC（The American Type Culture Collection）に登録されている CHO-K1 株（ATCC CCL-61）、DUXB11 株（ATCC CRL-9096）、Pro-5 株（ATCC CRL-1781）や、市販の CHO-S 株（Lifetechnologies 社 Cat#11619）、あるいはこれら株を様々な培地に馴化させた亜株なども具体的な例としてあげることができる。

本発明において、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に係わる酵素とは、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素のことを意味する。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースは、de novo の合成経路あるいは Salvage 合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべて細胞内 GDP-フコースの合成に係わる酵素に包含される。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの de novo の合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-mannose 4,6-dehydratase (GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ；以下、GMD と表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4,6-reductase (GDP-ケト-デオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4,6-リダクターゼ；以下、Fx と表記する) などがあげられる。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの Salvage 合成経路に関与する酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスフォリラーゼ；以下、GFPP と表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、GMD としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、GMD のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 65 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 65 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェ

ントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、Fx としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、Fx のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 48 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、GFPP としては、

下記(a)または(b)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(d) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質等があげられる。

また、GFPP のアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 51 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合する反応に影響を与える酵素を意味する。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する反応に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼや α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

また、上述の N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)の DNA がコードする蛋白質、

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA

または、

(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

また、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードする DNA としては、配列番号 1 または 2 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 1 または 2 で表される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする DNA などがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、2、48、51 または 65 で表される塩基配列を有する DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 M の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2 倍濃度の SS

C溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mM塩化ナトリウム、15 mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより、同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、2、48、51または65で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明において、配列番号23、24、71、72または73で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、2、65、48または51で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

また、本発明において、用いられる蛋白質が、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD活性、Fx活性またはGFPP活性を有するためには、それぞれ配列番号2

3、24、71、72または73で表されるアミノ酸配列とBLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やFASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)〕等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する。

本発明のCHO細胞としては、上述の酵素活性が低下または欠失した細胞があげられる。

上述の酵素活性が低下または欠失した細胞としては、すなわち、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が親株より低下または欠失した細胞を包含する。このような細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

ここで、レクチンに耐性である株は、ある一定濃度のレクチンを含む培地中で培養した場合に、親株に比べて統計的な有意差を伴って少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは5倍以上生存率に差が生じる性質を獲得する株を選択することで取得することができる。また、レクチンを含む培地中で培養した場合に、ある一定の生存率、例えば80%の生存率、で培養可能なレクチンの濃度が、親株に比べ少なくとも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍、さらに好ましくは20倍以上の濃度となる株を選択することでも取得することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (*Lens Culinaris* 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (*Pisum sativum* 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (*Vicia faba* 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (*Aleuria aurantia* 由来の Lectin) 等をあげることができる。

本発明の CHO 細胞は、上記の目的とする酵素活性を低下または欠失させる手法を施す前の親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

また、本発明の CHO 細胞は、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物を生産することができる。

本発明において親株としては、例えば、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下していない細胞があげられる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を低下または欠失させるような処理を施していない細胞が用いられる。

本発明において、ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する Fc レセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

本発明は、また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合等鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖修飾に関与する酵素の活性が、遺伝子工学的な手法により低下した細胞（以下、本発明の宿主細胞と略記する）に関する。本発明の宿主細胞は、ADCC 活性が高い抗体組成物を生産するための宿主細胞として有用である。

本発明の宿主細胞としては、抗体分子を発現できる宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。その例として、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞の具体的な例としては、後述の 3. に記載のものがあげられる。特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞、ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞、マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞、マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

(1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239, (1993)、バイオ／テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097, (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.), 5, 1083, (1995)、細胞工学, 13, 255, (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999)等に記載されたりリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

本発明の宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3. に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述の3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座3—糖質I, 糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロト

コール、糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)」、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

DNAの調製方法

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNA又はmRNAを調製する。

調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複

合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードするDNAを取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のごとくヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (A G P C) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全RNAから poly (A)⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社) を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、 λ gt10、 λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 λ

TriplEx (Clontech社)、 λ ExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、*Escherichia coli* C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、*Escherichia coli* Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、*Escherichia coli* NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、*Escherichia coli* K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

このcDNAライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をDNAをプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することもできる。

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNAシーケンサー

(PE Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号48、51または65に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または2に記載の塩基配列があげられる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) やUniversal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結

合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを単離することもできる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した5～150塩基、好ましくは5～60塩基、より好ましくは10～40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3'-P 5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導

体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

(b) 相同組換え法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「E S細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号67または70に記載の塩基配列があげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号3に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組

換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第2版）やPCR法〔ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)]等があげられる。

(c) RDO方法による本発明の細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO (RNA-DNA oligonucleotide) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「DNAの調製方法」などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該DNAの塩基配列を決定することができる。

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記1の(1)の(a)に記載の、導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の1の(5)に記載の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の

5 または後述の 6 に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RD0のコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386, (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285, (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462, (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829, (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768, (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323, (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43, (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555, (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi方法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に参与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に参与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に参与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に参与する酵素のcDNAを調製する。

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に参与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に参与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子のコンストラクトを設計する。

該RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを製作する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3.に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載されたDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RNAi遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502, (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999); セル(Cell), 95, 1017, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959, (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70, (2000)]等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 25, 35, (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3.に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3.に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細

胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、F_x、GFPP、Fucokinase などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸（133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている（Structure, 8, 2, 2000）。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDの結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD（配列番号65）では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3．に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の3．に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の3．に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結

合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。

(3) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GMD、F_x、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版（朝倉書店）日本組織培養学会編（1996）、ネイチャー・ジェネティクス（Nature Genet.），24，314，（2000）等に記載の方法をあげることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体をあげることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、前記1の（1）の（a）に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の5または後述の6に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の1の（5）に記載の方法があげられる。

（4）酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinaseなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与す

る酵素としては、具体的には、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.) , 12, 51, (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (*Lens Culinaris*由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (*Pisum sativum*由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (*Vicia faba*由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (*Aleuria aurantia*由来のLectin) 等をあげることができる。

具体的には、1 μ g/ml～1 mg/mlの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日～2週間、好ましくは1日～1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

上記方法で得られる株としては、例えば、後述の実施例14(2) で取得したCHO/CCR4-LCA株Nega-13 (FERM BP-7756) があげられる。

2. 本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、抗体分子の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的として、1.に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製することができる。

具体的は、染色体上の細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活

性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、1.に記載の手法と同様の手法を用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じてオーキシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位あるいは3位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下したトランスジェニック植物を作製することができる。

3. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと

略す)等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

抗体分子の全長cDNAを調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を、遺伝子工学的な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNAは、上記1の(1)の(a)に記載のDNAの調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスボロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius*等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポ

フェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法[マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法（羊土社）横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法[マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リボフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第2606856、日本特許第2517813] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc領域と他のタンパク質との融合タンパク質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の

炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、*trp*プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [ヴェウロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、

Whitten培地[発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium[ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイ特(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子で発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオテクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養，20（1994）；組織培養，21（1995）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology），15，45（1997）〕に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希

釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質などをあげることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の

初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)], モロニー Maus 白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)], 免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440

(1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する；モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列からH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖及びL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することによって見出すことができる。

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖及びL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRを移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク (以下、FRと表記する) のア

ミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖及びL鎖のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項3の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

(6) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、本項3の(5)で構築したヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項3の(5)でヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

(7) ヒト化抗体の安定的生産

本項3の(4)及び(6)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と称す)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、5に記載本発明の宿主細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate(以下、G418と表記する; SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用

培地としては、RPMI1640培地（白水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL302培地（JRH社製）、IMDM培地（GIBCO BRL社製）、Hybridoma-SFM培地（GIBCO BRL社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBSと表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法〔以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)〕やウエスタンブロッティング法〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、前記1.に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

4. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能はを測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

5. 各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法があげられる。BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-

pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J.Liq.Chromatogr.) , 6,1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agruc.Biol.Chem.) , 55(1),283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) , 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) , 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) , 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

6. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上であり、高いADCC活性を示す特徴を有している。このような抗体組成物は、上記6. に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルス・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウェスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (*T. vulgaris*由来のwheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis*由来のconcanavalin A)、RIC (*R. communis*由来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris*由来のleukoagglutinin)、LCA (*L. culinaris*由来のlentil agglutinin)、PSA (*P. sativum*由来のPea lectin)、AAL (*Aleuria aurantia* Lectin)、ACL (*Amaranthus caudatus* Lectin)、BPL (*Bauhinia purpurea* Lectin)、DSL (*Datura stramonium* Lectin)、DBA (*Dolichos biflorus* Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (*Erythrina cristagalli* Lectin)、EEL (*Euonymus europaeus* Lectin)、GNL (*Galanthus nivalis* Lectin)、GSL (*Griffonia simplicifolia* Lectin)、HPA (*Helix pomatia* Agglutinin)、HHL (*Hippeastrum Hybrid* Lectin)、Jacalin、LTL (*Lotus tetragonolobus* Lectin)、LEL (*Lycopersicon esculentum* Lectin)、MAL (*Maackia*

amurensis Lectin)、MPL (*Maclura pomifera* Lectin)、NPL (*Narcissus pseudonarcissus* Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (*Phaseolus vulgaris* Erythroagglutinin)、PTL (*Psophocarpus tetragonolobus* Lectin)、RCA (*Ricinus communis* Agglutinin)、STL (*Solanum tuberosum* Lectin)、SJA (*Sophora japonica* Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (*Ulex europaeus* Agglutinin)、VVL (*Vicia villosa* Lectin)、WFA (*Wisteria floribunda* Agglutinin)があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (*Lens Culinaris*由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (*Pisum sativum*由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (*Vicia faba*由来のAgglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (*Aleuria aurantia*由来のLectin) をあげることができる。

7. 本発明の抗体分子の利用

本発明の抗体組成物は高い抗体依存性細胞障害活性を有する。高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウィルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが[サイエンス (Science), 280, 1197, 1998]、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それらの疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウィルスまたは細菌に感染細胞を、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いてウィルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウィルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗GD2抗体 (Ohta et al., *Anticancer Res.*, 13, 331-336, 1993)、抗GD3抗体 (Ohta et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 260-266, 1993)、抗GM2抗体 (Nakamura et al., *Cancer Res.*, 54, 1511-1516, 1994)、抗HER2抗体 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289, 1992)、抗CD52抗体 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289, 1992)、抗MAGE抗体 (Jungbluth et al., *British J. Cancer*, 83, 493-497, 2000)、抗HM1.24抗体 (Ono et al., *Molecular Immunol.*, 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Ogata et al., *Cancer*, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗FGF8抗体 (Matsuzaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9911-9915, 1989)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8受容体抗体 (Kuo et al., *J. Biol. Chem.*, 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (Yao et al., *J. Neurosci. Res.*, 40, 647-659, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (Yao et al., *J. Neurosci. Res.*, 40, 647-659, 1995)、抗PMSA抗体 (Murphy et al., *J. Urology*, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Presta et al., *Cancer Res.*, 57, 4593-4599, 1997)、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Kanno et al., *Oncogene*, 19, 2138-2146, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン6抗体 (Abrams et al., *Immunol. Rev.*, 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキ

ン6受容体抗体 (Sato et al., *Molecular Immunol.*, **31**, 371-381, 1994)、抗インターロイキン5抗体 (Abrams et al., *Immunol. Rev.*, **127**, 5-24, 1992)、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 (Bird et al., *Cytokine*, **3**, 562-567, 1991)、抗インターロイキン4受容体抗体 (Jung et al., *J. Immunol. Meth.*, **217**, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Tempest et al., *Hybridoma*, **13**, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Amrani et al., *Molecular Pharmacol.*, **58**, 237-245, 2000)、抗CCR4抗体 (Campbell et al., *Nature*, **400**, 776-780, 1999)、抗ケモカイン抗体 (Peri et al., *J. Immunol. Meth.*, **174**, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (Wu et al., *J. Exp. Med.*, **186**, 1373-1381, 1997) であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体 (Co et al., *J. Immunol.*, **152**, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Ferns et al., *Science*, **253**, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (Shulman et al., *J. Biol. Chem.*, **272**, 17400-17404, 1997)、抗血液凝固因子抗体 (Peter et al., *Circulation*, **101**, 1158-1164, 2000) などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗gp120抗体 (Tugarinov et al., *Structure*, **8**, 385-395, 2000)、抗CD4抗体 (Schulze-Koops et al., *J. Rheumatology*, **25**, 2065-2076, 1998)、抗CCR4抗体、抗ペロ毒素抗体 (Karmali et al., *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 396-399, 1999) などがあげられる。

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所 (現：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター) 等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人 1 日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 20mg/kg である。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

図面の簡単な説明

第 1 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の SDS-PAGE (4～15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。1A 図が非還元条件、1B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-GD3 キメラ抗体、3 が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、4 が SP2/0-GD3 キメラ抗体、5 が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、6 が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT)、7 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 2 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 3 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 4 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。4A 図が非還元条件、4B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、3 が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、4 が NS0-hIL-5RCDR 抗体、5 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 5 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R α との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した結果を示した図である。縦軸は hIL-5R α との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NS0-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第 6 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R 発現マウス T 細胞株 CTLL-2 (h5R) に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体、●が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、□が NS0-hIL-5RCDR 抗体の活性をそれぞれ示す。

第 7 図は、精製した 3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体のカニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数 (抗体及び hIL-5 の投与開始日を 0 日とした) をそれぞれ示す。101、102 が抗体非投与群、301、302、303 が YB2/0-hIL-5RCDR 抗体投与群、401、402、403 が CHO/d-hIL-5RCDR 抗体投与群、501、502、503 が NS0-hIL-5RCDR 抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

第 8 図は、YB2/0 が生産した精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体 (8A 図) および NS0 が生産した精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体 (8B 図) の PA 化糖鎖の逆相 HPLC 溶離の溶離図 (左図) とその PA 化糖鎖を α -L-フコシダーゼ処理した後に逆相 HPLC で分析して得た溶離図 (右図) を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 9 図は、CHO/d 細胞が生産した精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 10 図で、10A 図は、非吸着画分、吸着画分の一部の GD3 との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそ

れぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。10B 図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

第 11 図は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製した PA 化糖鎖を逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。11A 図に非吸着画分の溶離図、11B 図に吸着画分の一部の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 12 図は、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体 (12A 図～12F 図) から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 13 図は、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 14 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 15 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 16 図は、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 17 図は、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 18 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。また、18A 図はドナーA、18 図はドナーB のエフェクター細胞を用いた結果を示す。

第 19 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 20 図は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 21 図は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

第 22 図は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 23 図は、プラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS の構築を示した図である。

第 24 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた各宿主細胞株における FUT8 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/0 細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第 25 図は、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 26 図は、プラスミド pBSmfFUT8 の構築を示した図である。

第 27 図は、プラスミド pAGEmfFUT8 の構築を示した図である。

第 28 図は、競合的 RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸に β -アクチン転写量に対する FUT8 転写量の相対値を示す。

第 29 図は、FUT8 遺伝子過剰発現株より精製した抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。30A 図に mfFUT8-6 株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖、30B 図に pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 32 図は、プラスミド CHfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 33 図は、プラスミド ploxPPuro の構築を示した図である。

第 34 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築を示した図である。

第 35 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築を示した図である。

第 36 図は、プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 37 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築を示した図である。

第 38 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築を示した図である。

第 39 図は、プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築を示した図である。

第 40 図は、プラスミド pKOFUT8Puro の構築を示した図である。

第 41 図は、 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ 遺伝子破壊 CHO 細胞株である 1st.△FUT8 2-46-1 株及び 1st.△FUT8 2-46 株のゲノムサザン解析結果を示した図である。

第 42 図は、FUT8 対立遺伝子破壊株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲、■はそれぞれ、抗 CCR4 キメラ抗体産生 CHO 細胞 5-03 株由来の精製抗体および 1st.△FUT8 2-46-1 株由来の精製抗体の活性をそれぞれ示す。

第 43 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は 5-03 株、■は CHO/CCR4-LCA 株、◆は CHO/CCR4-AAL 株、▲は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 44 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は YB2/0 株 (KM2760#58-35-16)、△は 5-03 株、●は CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 45 図は、精製した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。45A 図は 5-03 株が生産する抗体、45B 図は CHO/CCR4-LCA 株が生産する抗体、45C 図は CHO/CCR4-AAL 株が生産する抗体、および 45D 図は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の分析結果を示す。

第 46 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 1 の工程を示した図である。

第 47 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 2 の工程を示した図である。

第 48 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 3 の工程を示した図である。

第 49 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 4 の工程を示した図である。

第 50 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 5 の工程を示した図である。

第 51 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 6 の工程を示した図である。

第 52 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示した図である。LCA レクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を 100%とし、2 回測定を行った図である。図中 249 は、発現ベクター pAGE249 を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する生存率を示す。GMD は GMD 発現ベクター pAGE249GMD を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示す。

第 53 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の細胞群が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 54 図は、CHO 細胞由来の GMD cDNA クローン 22-8 の 5' 末端にクローン 34-2 の 5' 末端を導入したプラスミド CHO-GMD の作製工程を示した図である。

第 55 図は、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChiLHGM4 の構築

抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 GD3 キメラ抗体と表記する）の L 鎖の発現ベクター pChi641LGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 4.03kb の断片と動物細胞用発現ベクター pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる G418 耐性遺伝子及びスプライシングシグナルを含む約 3.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社

製)を用いて連結、大腸菌 HB101 株 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクター pChi641HGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる H 鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB101 株 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5 μ g を 4 $\times 10^6$ 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662, J.V. Kilmarin et al., J. Cell. Biol. 93, 576-582 (1982)] ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10) [FBS (GIBCO BRL 社製) を 10% 含む RPMI1640 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、

上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、DHFR の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTX と表記する；SIGMA 社製）を 50nM 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 2ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1～2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

このようにして得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-9-51 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6））に FERM BP-6691 として寄託されている。

(2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 4 μ g を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞[G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220 (1980)] ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-FBS(10) [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート

(岩城硝子社製) に 200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 10nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地 [透析牛胎児血清 (以下、dFBS と表記する ; GIBCO BRL 社製) を 10% 含む IMDM 培地] に 1~2 $\times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、10nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 100nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(3) マウスミエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5 μ g を 4 $\times 10^6$ 細胞のマウスミエローマ NS0 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, 1990] により導入後、40ml の EX-CELL302-FBS(10) [FBS を 10%、L-グルタミン (以下、L-Gln と表記する ; GIBCO BRL 社製) を 2mM 含む EX-CELL302 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 50nM 含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地 (dFBS を 10%、L-Gln を 2mM 含む EX-CELL302 培地) に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

3. 抗体の GD3 に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の GD3 に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmol の GD3 を 10 μ g のジパルミトイルフォスファチジルコリン (SIGMA 社製) と 5 μ g のコレステロール (SIGMA 社製) とを含む 2ml のエタノール溶液に溶解した。該溶液の 20 μ l (40pmol/ウェルとなる) を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン (以下、BSA と表記する; SIGMA 社製) を含む PBS (以下、1%BSA-PBS と表記する) を 100 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を 50 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween20 (和光純薬社製) を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualalex 社製) を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時

間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1 μ l/ml で添加した溶液 (以下、同様)] を 50 μ l/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

4. 抗 GD3 キメラ抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (1) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを BSA を 0.2%、MTX を 200nM、トリヨードチロニン (以下、T3 と表記する; SIGMA 社製) を 100nM の濃度で含む Hybridoma-SFM 培地に 3 \times 10⁵細胞/ml となるように懸濁し、2.0L スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 50rpm の速度で攪拌培養した。37°C の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、YB2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

(2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (2) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、脂肪酸濃縮液 (以下、CDLC と表記する; GIBCO BRL 社製) を 0.5%、プルロニック F68 (以下、PF68 と表記する; GIBCO BRL 社製) を 0.3% の濃度で含む EX-CELL302 培地に 1 \times 10⁶細胞/ml となるように懸濁し、175mm² フラスコ (Greiner 社製) に 50ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3 キメラ抗体と名付けた。

(3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 2mM、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM、FBS を 1% の濃度で含む EX-

CELL302 培地に 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁し、175mm² フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、175mm² フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) と名付けた。

(4) SP2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

特開平 5-304989 (EP533199) に記載の抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン (KM-871 (FERM BP-3512)) を G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3×10^5 細胞/ml となるように懸濁し、175mm² フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、SP2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

5. 精製した抗 GD3 キメラ抗体の解析

上記実施例 1 の 4 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各 4μg を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, 1970] に従って SDS-PAGE し、分子量及び精製度を解析した。その結果を第 1 図に示した。第 1 図に示したように、精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖 : 約 49Kd、L 鎖 : 約 23Kd、分子全

体：約 144Kd）とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合（以下、S-S 結合と表記する）が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、各抗 GD3 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

実施例 2. 抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

1. 抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性 (ELISA 法)

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の GD3（雪印乳業社製）に対する結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。第 2 図は、添加する抗 GD3 キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 2 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、ほぼ同等の GD3 に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

2. 抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で

懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 2×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、各種抗 GD3 キメラ抗体を各最終濃度 $0.0025 \sim 2.5 \mu\text{g/ml}$ となるように加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式（II）により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100 \quad (\text{II})$$

その結果を第 3 図に示した。第 3 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3 キメラ抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで SP2/0-GD3 キメラ抗体、NS0-GD3 キメラ抗体、CHO-GD3 キメラ抗体の順に高い ADCC 活性を示した。培養に用いた培地の異なる NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) では、それらの ADCC 活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体の Fc 領域の構造の差に起因していることが推定された。

実施例 3. 抗ヒトインターロイキン 5 レセプター α 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の作製

1. 抗ヒトインターロイキン 5 レセプター α 鎖ヒト型 CDR 移植抗体の安定生産細胞の作製

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

W097/10354 に記載の抗ヒトインターロイキン 5 レセプター α 鎖ヒト型 CDR 移植抗体 (以下、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体と表記する) の発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 の 5 μ g を 4×10^6 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, 1990] により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10) に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 50nM 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュ

ベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。このようにして得られた抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローン No.3 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）（現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6））に FERM BP-6690 として寄託されている。

(2) CHO/dhfr-細胞を用いた生産細胞の作製

W097/10354 に記載の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 の 4 μ g を 1.6×10^6 細胞の CHO/dhfr-細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-FBS(10) に懸濁し、96 ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に 200 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の抗原結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/ml、MTX を 10nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート（岩城硝子社製）に 0.5ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、10nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。

増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、500nM に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/ml、MTX を 500nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(3) マウスミエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

ヤラントン (Yarranton) らの方法 [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)] に従い、W097/10354 に記載の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクター pKANTEX1259HV3LV0 上の抗体 H 鎖及び L 鎖 cDNA を用いて抗 hIL-5R α CDR 移植抗体発現ベクターを作製し、NS0 細胞を形質転換し、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として用いた。

2. 抗体の hIL-5R α に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の hIL-5R α に対する結合活性は以下のようにして測定した。

W097/10354 に記載の抗 hIL-5R α マウス抗体 KM1257 を PBS で 10 μ g/ml の濃度に希釈した溶液の 50 μ l を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、4°C で 20 時間反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100 μ l/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、W097/10354 に記載の可溶性 hIL-5R α を 1%BSA-PBS で 0.5 μ g/ml の濃度に希釈した溶液を 50 μ l/ウェルで加え、4°C で 20 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型 CDR 移植抗体の各種希釈溶液を 50 μ l/ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗

ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50 μ l/ウェルに加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50 μ l/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

3. 抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (1) で得られた抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/ml、MTX を 200nM の濃度で含む GIT 培地に 3 \times 10⁵細胞/ml となるように懸濁し、175mm² フラスコ (Greiner 社製) に 200ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

(2) CHO/dhfr-細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (2) で得られた抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mM、CDLC を 0.5%、PF68 を 0.3% の濃度で含む EX-CELL302 培地に 3 \times 10⁵細胞/ml となるように懸濁し、4.0L スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 100rpm の速度で攪拌培養した。37°C の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

(3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 3 の 1 項 (3) で得られた抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を生産する形質転換細胞クローンを ヤラントン (Yarranton) らの方法 [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)] に従い、培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を精製した。精製した抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、NS0-hIL-5RCDR 抗体と名付けた。

4. 精製した抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の解析

上記実施例 3 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の各 4 μ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量及び精製度を解析した。その結果を第 4 図に示した。第 4 図に示したように、精製した各抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、各抗 hIL-5R α CDR 移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ、精製されたことが確認された。

実施例 4. 抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の活性評価

1. 抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R α に対する結合活性 (ELISA 法)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の hIL-5R α に対する結合活性を実施例 3 の 2 項に示す ELISA 法により測定した。第 5 図は、添加する抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 5 図に示したように、3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体は、ほぼ同等の hIL-5R α に対する結合活性を示した。この結果は実施例 2 の 1 項の結果と同様に、抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。

2. 抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

W097/10354 に記載の hIL-5R α 鎖及び β 鎖を発現しているマウス T 細胞株 CTLL-2(h5R) を RPMI1640-FBS(10) 培地で培養し、 1×10^6 細胞/0.5ml となるように調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1.5 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 2×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Polymorphprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 9×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の 50 μ l (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を 100 μ l (9×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 90:1 となる) 添加した。更に、各種抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を各最終濃度 0.001~0.1 μ g/ml となるように加え、37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみ

を、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式 (II) により求めた。

その結果を第 6 図に示した。第 6 図に示したように、3 種類の抗 hIL-5R α CDR 移植抗体のうち、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで CHO/d-hIL-5RCDR 抗体、NS0-hIL-5RCDR 抗体の順に高い ADCC 活性を示した。以上の結果は実施例 2 の 2 項の結果と同様に、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、2 種類のヒト化抗体のいずれの場合も YB2/0 細胞で生産した抗体が最も高い ADCC 活性を示したことから、YB2/0 細胞を用いることにより、ADCC 活性の高い抗体を製造できることが明らかとなった。

3. 抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の in vivo における活性評価

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の in vivo における活性を評価するため、以下に示す方法に従い、カニクイザルの hIL-5 誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を検討した。

カニクイザルに初日より hIL-5 (調製方法は W097/10354 に記載) を $1\mu\text{g}/\text{kg}$ で 1 日 1 回、計 14 回背部皮下より投与した。各種抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を 0 日の hIL-5 の投与 1 時間前に $0.3\text{mg}/\text{kg}$ で静脈内に単回投与した。抗体非投与群をコントロールとして用いた。抗体投与群は各群 3 頭 (No.301、No.302、No.303、No.401、No.402、No.403、No.501、No.502、No.503)、抗体非投与群は 2 頭 (No.101、No.102) のカニクイザルを用いた。投与開始の 7 日前より投与後 42 日目まで経時的に約 1ml の血液を伏在静脈または大腿静脈より採取し、 $1\mu\text{l}$ の末梢血中の好酸球数を測定した。その結果を第 7 図に示した。第 7 図に示したように、YB2/0-hIL-5RCDR 抗体を投与した群では、血中好酸球の増加が完全に抑制された。一方、CHO/d-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、1 頭で完全な抑制作用が認められたものの、2 頭ではその抑制作用は不十分であった。NS0-hIL-5RCDR 抗体の投与群では、完全な抑制作用は認められず、その効果は不十分であった。

以上の結果は、抗体の in vivo 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、抗 hIL-5R α CDR 移植抗体ではその in vivo 活性の高さは、

実施例 4 の 2 項で述べた ADCC 活性の高さと正の相関が認められたことから、その活性発現には、ADCC 活性の高さが極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、ADCC 活性の高い抗体は、ヒトの各種疾患の臨床においても有用であることが期待される。

実施例 5. ADCC 活性を高める糖鎖の解析

1. 2-アミノピリジン標識糖鎖 (PA 化糖鎖) の調製

本発明のヒト化抗体を塩酸による酸加水分解にてシアル酸を除去した。塩酸を完全に除去した後、ヒドラジン分解により糖鎖をタンパク質から切断した [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)]。蛍光標識した糖鎖 (PA 化糖鎖) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて不純物と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖とした。

2. 精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の PA 化糖鎖の逆相 HPLC 分析

上記実施例 5 の 1 項の方法で実施例 3 で作製された各種抗 hIL-5R CDR 抗体について PA 化糖鎖を行った後、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) による逆相 HPLC 分析を行った。過剰量の α -L-フコシダーゼ (ウシ腎由来、SIGMA 社製) を PA 化糖鎖に添加して消化を行い (37°C、15 時間)、逆相 HPLC で分析した (第 8 図)。アスパラギン結合糖鎖は 30 分間から 80 分間の範囲に溶出することを TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードを用いて確認した。 α -L-フコシダーゼ消化によって、逆相 HPLC の溶出位置が移動する糖鎖 (48 分間から 78 分間に溶出される糖鎖) の全体に占める割合を計算した。結果を第 1 表に示す。

第 1 表

抗体の生産細胞	α -1, 6-フコース結合糖鎖 (%)
YB2/0	47
NS0	73

YB2/0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 47%、NS0 細胞で生産させた抗 hIL-5RCDR 移植抗体は約 73%が N グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合した糖鎖（以下、「 α -1, 6-フコースを持つ糖鎖」とも表記する）であった。よって、YB2/0 細胞で生産した抗体は、NS0 細胞で生産した抗体と比較して N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースが結合していない糖鎖（以下、単に、「 α -1, 6-フコースを持たない糖鎖」と表記する）の割合が α -1, 6-フコースを持たない糖鎖が多かった。

3. 精製抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の単糖組成分析

トリフルオロ酢酸による酸加水分解により、YB2/0 細胞、NS0 細胞および CHO/d 細胞で生産した抗 hIL-5R α CDR 移植抗体の糖鎖を単糖に分解し、BioLC (Dionex 社製) を用いて単糖組成分析を行った。

N-グリコシド結合糖鎖のうち、コンプレックス型では、1 本の糖鎖におけるマンノース数は 3 であるため、マンノースを 3 として計算した場合の各単糖の相対比を第 2 表に示す。

第 2 表

抗体の生産細胞	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	ADCC 活性 (%)*
YB2/0	0.60	4.98	0.30	3.00	42.27
NS0	1.06	3.94	0.66	3.00	16.22
CHO/dhfr-	0.85	3.59	0.49	3.00	25.73
CHO/dhfr-	0.91	3.80	0.27	3.00	25.73

*抗体濃度 0.01 μ g/ml

フコースの相対比は、YB2/0<CHO/d<NS0 であり、本結果でも YB2/0 細胞で生産した抗体の糖鎖はフコース含量が最も低かった。

4. CHO/dhfr-細胞生産抗体の糖鎖解析

CHO/dhfr-細胞で生産した精製抗 hIl-5R α CDR 移植抗体から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム（島津社製）を用いて逆相 HPLC 分析を行った（第 9 図）。第 9 図において、溶出時間 35～45 分間がフコースを持たない糖鎖、45～60 分間がフコースを持つ糖鎖であった。CHO/dhfr-細胞で生産した抗 hIl-5R α CDR 移植抗体は、マウスミエローマ NS0 細胞で生産させた抗体と同様に、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗体よりもフコースを持たない糖鎖の含量が少なかった。

実施例 6. 高 ADCC 活性抗体の分離

フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、ラットミエローマ YB2/0 細胞で生産させた抗 hIl-5R α CDR 移植抗体の分離を行った。HPLC は島津社製 LC-6A を用い、流速は 1ml/分、カラム温度は室温で行った。50mM トリス-硫酸緩衝液 (pH7.3) で平衡化し、精製された抗 hIL-5R α CDR 移植抗体を注入後、0.2M α -メチルマンノシド（ナカライテスク社製）の直線濃度勾配（60 分間）にて溶出した。抗 hIl-5R α CDR 移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分離した。非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R α に対する結合活性を測定すると、同様の結合活性を示した（10A 図）。ADCC 活性を測定すると、非吸着画分の方が吸着画分の一部よりも高い（100～1000 倍）ADCC 活性を示した（10B 図）。さらに、非吸着画分、吸着画分の一部から PA 化糖鎖を調製し、CLC-ODS カラム（島津社製）を用いて逆相 HPLC 分析を行った（第 11 図）。非吸着画分は主としてフコースのない糖鎖をもつ抗体であり、吸着画分の一部は主としてフコースがある糖鎖もつ抗体であった。

実施例 7. α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

1. α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 2 項 (1) に記載した方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体を生産する YB2/0 細胞由来の形質転換クローンを得た。それぞれの YB2/0 細胞由来の形質転換クローンより抗体を調製し、それぞれをロット 1、ロット 2、ロット 3 とした。抗 GD3 キメラ抗体ロット 1、ロット 2、ロット 3 の糖鎖分析を、実施例 11 の (6) の方法に従って行った結果、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ 50%、45%、29%であった。以下、これらの試料を、抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、抗 GD3 キメラ抗体 (29%) と表記する。

また、実施例 1 の 2 項 (2) で調製した CHO/DG44 細胞由来の抗 GD3 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 11 の (6) の方法に従って行った結果、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、7%であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (7%) と表記する。

さらに、抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) を用い、抗 GD3 キメラ抗体 (45%):抗 GD3 キメラ抗体 (7%)=5:3 および 1:7 の割合で混合した。これらの試料を、実施例 10 の (6) の方法に従って糖鎖分析を行った結果、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 24%および 13% (分析値) の試料を調製した。これらを以下、抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、抗 GD3 キメラ抗体 (13%) と表記する。

第 12 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2 回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

2. GD3 に対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 7 の 1 項で調製した α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 (雪印乳業社製) に対する結合活性は、実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。その結果、第 13 図に示したように、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも同等の GD3 に対する結合活性を示し、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

3. ヒトメラノーマ細胞株に対する ADCC 活性の評価

抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

ヒトメラノーマ細胞株 G-361 の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1 時間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を 5mL 加え、 2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を 0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20 分間) して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離 (1200rpm、5 分間) して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/mL の濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したヒトエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{L}$ (2×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。さらに、抗 GD3 キメラ抗体を各最終濃度 $0.0005 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ となるように加え、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、ヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、

上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。細胞障害活性 (%) は前記式 (II) により求めた。

第 14 図および第 15 図には、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各種濃度 ($0.0005 \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$) における ADCC 活性を 2 名の健康人ドナー (A、B) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 14 図および第 15 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性は、いずれの抗体濃度においても α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ では、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が 24%、29%、45% および 50% の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が 20% 未満の抗体である、13% および 7% では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 8. α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の活性評価

1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

W001/64754 記載の抗 CCR4 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

(1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

$10 \mu\text{g}$ の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 を 4×10^6 細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAA ラボラトリーズ社製) を 5% 含む Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に $200 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。5% CO_2 インキュベーター内で 37°C 、24 時間培養した後、G418 を $1\text{mg}/\text{mL}$ になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 1mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nM 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 1ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行い、得られたクローン化株を KM2760#58-35-16 と名付けた。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

(2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の 4 μ g を 1.6×10^6 細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10ml の IMDM-dFBS(10)-HT(1) [dFBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 100 μ l/ウェルずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、IMDM-dFBS(10) (透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地) に培地交換し、1~2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現したため、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 8 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nM 含む IMDM-dFBS(10) 培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレート

(岩城硝子社製) に 0.5ml ずつ分注した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nM に上昇させ、最終的に MTX を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。尚、実施例 9 に示す α -1,6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

2. 抗体 CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 25) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (Bovine Serum Albumin) (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100ml の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を vortex しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした (A_{280} 測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を vortex 下で添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4°C、一晚透析し、最終濃度 0.05%となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22 mm フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 穴の EIA 用プレート (グライナー社) に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05 μ g/mL、50 μ l/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを 0.05%Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したベルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(γ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次

抗体溶液として、それぞれ 50 μ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50 μ L/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5% SDS 溶液を 50 μ L/ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。実施例 8 の 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

3. 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

(1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760#58-35-16 を 200nM MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に 2×10^5 細胞/ml となる様に懸濁し、スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 37°C の恒温室内で Fed-Batch 攪拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A (ミリポア社製) カラム及びゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-1 と名づけた。

(2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

実施例 8 の 1 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を生産する形質転換細胞株 5-03 株を IMDM-dFBS(10) 培地中で、182cm² フラスコ (Greiner 社製) にて 5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を 35ml 注入した。5%CO₂ インキュベーター内で 37°C にて 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体は KM3060 と名付けた。

KM2760-1 および KM3060 の CCR4 に対する結合活性を ELISA により測定した結果、同等の結合活性を示した。

4. 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

本実施例 1 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4 μ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227,680, 1970] に従って SDS-PAGE し、分子量及び製精度を解析した。精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖及び L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖 : 約 49Kd、L 鎖 : 約 23Kd、分子全体 : 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ : ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ : プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

5. α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 8 の 3 項 (1) で調製した、YB2/0 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 と、実施例 8 の 3 項 (2) で調製した、CHO/DG44 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060 の糖鎖分析を、実施例 10 の (6) の方法に従って行った。 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、KM2760 は 87%、KM3060 は 8%であった。以下、これらの試料を、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と表記する。

さらに、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) と抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) を用い、抗 CCR4 キメラ抗体 (87%):抗 CCR4 キメラ抗体 (8%)=1:39、16:67、22:57、32:47、42:37 の割合で混合した。これらの試料を実施例 10 の (6) の方法にしたがって糖鎖分析を行なった。 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、それぞれ 9%、18%、27%、39%、46%であった。以下、これらの試料を抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、抗 CCR4 キメラ抗体 (46%) と表記する。

第 16 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、2 回の結果を平均した値を用いた。

6. CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 8 の 5 項で調製した α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性は実施例 8 の 2 に記載の方法に従って測定した。

その結果、第 17 図に示したように、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

7. ヒト CCR4 高発現細胞株に対する ADCC 活性の評価

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト CCR4 高発現細胞である CCR4/EL-4 細胞 (W001/64754) に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754 に記載のヒト CCR4 を発現している CCR4/EL-4 細胞の 1.5×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 5.55MBq 当量加えて 37°C で 1 時間 30 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、培地を用いた懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた遠心分離後、培地を 7.5mL 加え、 2×10^5 細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

(2) ヒトエフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 60mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) を 0.6mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20 分間) して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離 (1400rpm、5 分間) して洗浄後、培地を用いて 5×10^6 細胞/mL の濃度で再懸濁し、ヒトエフェクター細胞溶液とした。

(3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50\mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したヒトエフェクター細胞溶液を $100\mu\text{L}$ (5×10^5 細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる) 添加した。さらに、抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度 $0.0001 \sim 10\mu\text{g/mL}$ となるように加え、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性 (%) は前記式 (II) により求めた。

第 18 図および第 19 図には、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の各種濃度 ($0.001 \sim 10\mu\text{g/mL}$) における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー (A, B) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 18 図および第 19 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性はいずれの抗体濃度においても α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が $0.01\mu\text{g/mL}$ では、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が 27%、39% および 46% の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖が 20% 未満の抗体では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 9. 宿主細胞株における α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の転写物の定量

(1) 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞およびラットミエローマ YB2/0 細胞より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。

CHO/DG44 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、YB2/0 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製)、4mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製) を添加した RPMI1640 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

全 RNA を 45 μ l の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1 μ l、付属の 10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5 μ l をそれぞれに添加して、37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50 μ l の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA 3 μ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20 μ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。各宿主細胞由来 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (以下、FUT8 ともいう)、 β -アクチンのクローニングには該反応液の 1 倍濃度液を、競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量には該反応液の 50 倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで -80°C で保管した。

(2) チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得は、以下の手順で行った (第 20 図)。

まず、ヒト FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 121, 626, (1997)] およびブタ FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・

ケミストリー (J. Biol. Chem.), 271, 27810, (1996)] に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 4 および配列番号 5 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養 2 日目の CHO 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA を各々 $1\mu\text{l}$ を含む $25\mu\text{l}$ の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、 0.2mmol/l dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/l}$ 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 4 および配列番号 5)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、 94°C で 1 分間の加熱の後、 94°C で 30 秒間、 55°C で 30 秒間、 72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 979bp を GENECLAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて精製し、滅菌水 $10\mu\text{l}$ で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 $4\mu\text{l}$ を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 (配列番号 6 および 7 に示す) のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHFUT8-pCR2.1 および YBFUT8-pCR2.1 と称す。

(3) チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン cDNA の取得

チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンの取得は、以下の手順で行った (第 21 図)。

まず、チャイニーズハムスター β -アクチンゲノム配列 (GenBank, U20114) およびラット β -アクチンゲノム配列 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 11, 1759 (1983)] より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 8 に示す) および翻訳終止コドンを含む各配列特異的なリバースプライマー (配列番号 9 および配列番号 10 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、本項 (1) で調製した培養 2 日目の CHO 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA 1 μ l を含む 25 μ l の反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl₂、0.4 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 8 および 9、または配列番号 8 および 10)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 4 分間の加熱の後、98°C で 15 秒間、65°C で 2 秒間、74°C で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1128bp を精製した。この DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い DNA 5' 末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 10 μ l に溶解した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) 3 μ g (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、16 単位の制限酵素 EcoRV (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ l を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 100 μ l に溶解した。

上記で得たチャイニーズハムスター cDNA 由来増幅断片およびラット cDNA 由来増幅断片 (1192bp) 4 μ l、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRV-EcoRV 断片 (約 3.0Kb) 1 μ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換

し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン各 cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHAc-pBS および YBAc-pBS と称す。

(4) FUT8 スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内の FUT8 遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 *EcoRI* で切断し直鎖化した DNA を用いた。FUT8 定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の *ScaI*-*HindIII* 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 *EcoRI* で切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHFT8-pCR2.1 2 μ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40 μ l に溶解し、24 単位の制限酵素 *EcoRI* (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8-pCR2.1 2 μ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40 μ l に溶解し、24 単位の制限酵素 *EcoRI* (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 各 cDNA 部分断片を含む *EcoRI*-*EcoRI* 断片 (約 1Kb) がプラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、1 μ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 0.02fg/ μ l、0.2fg/ μ l、1fg/ μ l、

2fg/ μ l、10fg/ μ l、20fg/ μ l、100fg/ μ l の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードとした。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールの調製は次のように行った (第 22 図)。DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 5ng を含む 25 μ l の反応液 [KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl₂、0.4 μ mol/l 遺伝子特異的プライマー (配列番号 11 および 12)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°Cで 4 分間の加熱の後、98°Cで 15 秒間、65°Cで 2 秒間、74°Cで 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 4.7Kb を精製した。該 DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い DNA5' 末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 50 μ l に溶解した。上記で得た DNA 断片 (約 4.7Kb) 5 μ l および Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ l を混合し、16°Cで 30 分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列 ScaI-HindIII 間 203bp が欠失したことを確認した。得られた各プラスミドを CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 と称す。

次にプラスミド CHFT8d-pCR2.1 2 μ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40 μ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8d-pCR2.1 2 μ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40 μ l に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 部分断片の内部塩基配列 203bp が欠失した断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 800bp) がプラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 より分離されたことを確認した。

各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて $2\text{fg}/\mu\text{l}$ の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールとした。

(5) β -アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の β -アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBac-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。 β -アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBac-pBS のうち、チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAcΔ-pBS および YBacΔ-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS $2\mu\text{g}$ を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) $40\mu\text{l}$ に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBac-pBS $2\mu\text{g}$ を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) $40\mu\text{l}$ に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.2Kb) がプラスミド CHAc-pBS および YBac-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて $2\text{pg}/\mu\text{l}$ 、 $1\text{pg}/\mu\text{l}$ 、 $200\text{fg}/\mu\text{l}$ 、 $100\text{fg}/\mu\text{l}$ 、 $20\text{fg}/\mu\text{l}$ の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンのスタンダードとした。

チャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った（第 23 図）。CHAc-pBS 2 μ g を 100ng/ μ l BSA（New England Biolabs 社製）を含む NEBuffer 3（New England Biolabs 社製）100 μ l に溶解し、10 単位の制限酵素 DraIII（New England Biolabs）を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った後、反応液を 2 等分した。まず一方の反応液には、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）3.5 μ l を添加し、65°C で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。残る他方の反応液は 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター β -アクチン ORF 部分断片を含む約 1.1Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化 DraIII-DraIII 断片 0.5 μ l、約 1.1Kb の DraIII-DraIII 断片 4.5 μ l、Ligation High（東洋紡績社製）5 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377（Parkin Elmer 社製）および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Parkin Elmer 社製）を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター β -アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したことを確認した。本プラスミドを CHAc-d-pBS と称す。

また、ラット β -アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したプラスミドを CHAc-d-pBS と同様の工程を経て作製した。本プラスミドを YBAcd-pBS と称す。

次にプラスミド CHAc-d-pBS 2 μ g を NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）40 μ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 20 単位の PstI（宝酒造社製）を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAcd-pBS 2 μ g を NEBuffer 2（New England Biolabs 社製）40 μ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII（宝酒造社製）および 24 単位の KpnI（宝酒造社製）を加えて 37°C で 3 時間

消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン各 cDNA ORF 全長の内部塩基配列 180bp が欠失した断片を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.0Kb) がプラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、1 μ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 200fg/ μ l の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンの内部コントロールとした。

(6) 競合的 PCR による転写量の定量

本項 (4) で作製した FUT8 内部コントロール DNA および本項 (1) で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として競合的 PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の FUT8 の転写産物の定量値を算出した。一方、 β -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 β -アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、本項 (5) で作製した β -アクチン内部コントロール DNA および本項 (1) で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の β -アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

FUT8 の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 ORF 部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット (配列番号 13 および 14 に示す) を設計した。

次に、本項 (1) で得た各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μ l および内部コントロール用プラスミド 5 μ l (10fg) を含む総体積 20 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5%DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°Cで 3 分間の加熱の後、94°Cで 1 分間、60°Cで 1 分間、72°Cで 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項 (4) で得た FUT8 スタンダードプラスミド 5 μ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。

β -アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン ORF 全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット (前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す) をそれぞれ設計した。

次に、本項 (1) で得られた各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μ l および内部コントロール用プラスミド 5 μ l (1pg) を含む総体積 20 μ l の反応液 [ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 15 および配列番号 16、または配列番号 17 および配列番号 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、65°C で 1 分間、72°C で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、本項 (5) で得た β -アクチンスタンダードプラスミド 5 μ l (10pg、5pg、1pg、500fg、100fg) を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 β -アクチン転写量の検量線作製に用いた。

第 3 表

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ (bp)	
		ターゲット	コンベティター
FUT8	F : 5' -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R : 5' -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
β -actin (チャイニーズハムスター)	F : 5' -GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3' R : 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGGC-3'	789	609
β -actin (ラット)	F : 5' -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3' R : 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609

*F : フォワードプライマー、R : リバースプライマー

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンベティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7 μ lを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製)に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製)で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を第24図に示した。培養期間を通じてCHO細胞株はYB2/0細胞株の10倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第4表に β -アクチン転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じてYB2/0細胞株のFUT8転写量が β -アクチンの0.1%前後であるのに対し、CHO細胞株は0.5%~2%であった。

以上の結果より、YB2/0細胞株のFUT8転写産物量はCHO細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第4表

細胞株	培養日数				
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

実施例 10. 抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞株における α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の転写物の定量

(1) 各種生産細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体生産細胞 DCHI01-20 株および 61-33 株より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。DCHI01-20 株は、実施例 1 第 2 項 (2) 記載の CHO/DG44 細胞由来の形質転換クローンである。また 61-33 株は、YB2/0 由来の形質転換細胞 7-9-51 株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

DCHI01-20 株を 3mmol/l L-GLN (Life Technologies 社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies 社製) および 0.5% 脂肪酸濃縮液 (Life Technologies 社製) を添加した EXCELL302 培地 (JRH BIOSCIENCES 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。また、61-33 株を 0.2% ウシ血清アルブミンフラクション V (Life Technologie 社製) (以下、BSA と略記する) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。これらを 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞 1×10^7 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

全 RNA を 45 μ l の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1 μ l、付属の 10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5 μ l をそれぞれに添加して、37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50 μ l の滅菌水に溶解した。

得られた全 RNA 3 μ g に対し、SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20 μ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、使用するまで -80°C で保管した。

(2) 競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量

本項 (1) で得た抗体生産細胞株由来 cDNA に対し、実施例 9 (6) に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (2) で得たチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 *EcoRI* で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (4) で調製した CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の *ScaI-HindIII* 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 *EcoRI* で切断し直鎖化した DNA を用いた。

本項 (1) で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μ l および内部コントロール用プラスミド 5 μ l (10fg) を含む総体積 20 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5 μ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1 μ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、 β -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 β -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

β -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (3) で調製したチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチン

の cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBac-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

β -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (5) で調製した、CHAc-pBS および YBac-pBS のうちチャイニーズハムスター β -アクチンおよびラット β -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAc-d-pBS および YBac-d-pBS を、制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μ l および内部コントロール用プラスミド 5 μ l (1pg) を含む総体積 20 μ l の反応液 [ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l β -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、65°C で 1 分間、72°C で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、 β -アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 β -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1 μ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7 μ l を 1.75% アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産

物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 5 表に β -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0 細胞由来抗体生産株 61-33 の FUT8 転写量が β -アクチンの 0.3% 以下であるのに対し、CHO 細胞由来抗体生産株 DCHI01-20 は 0.7~1.5% であった。この結果より、YB2/0 細胞由来抗体生産株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 5 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

実施例 11. マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

(1) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 発現プラスミドの構築

10%ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む IMDM 培地 (Life Technologie 社製) で継代培養したマウスミエローマ NS0 細胞 (理化学研究所セルバンク, RCB0213) 1×10^7 個に対し、RNAeasy (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い全 RNA を抽出した。全 RNA を $45 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) $1 \mu\text{l}$ 、付属の $10 \times$ DNase buffer $5 \mu\text{l}$ 、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) $0.5 \mu\text{l}$ を添加して、 37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、 $50 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解した。得られた全 RNA のうち $3 \mu\text{g}$ に対し、SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした $20 \mu\text{l}$ の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

マウス FUT8 cDNA の取得は以下の手順で行った (第 25 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列 (GenBank, AB025198) より、翻訳開始コドンを含む配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 19 に示す) および翻訳終止コドンを含む配列特異的なリバースプライマー (配列番号 20 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述の NS0 細胞由来 cDNA 1 μ l を含む 25 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4% DMSO、0.5 μ mol/l 上記特異的プライマー (配列番号 19 および配列番号 20)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1728bp を精製した。この DNA 断片 4 μ l を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、マウス FUT8 の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した (その DNA 配列を配列番号 2 に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号 24 に示す)。尚、本配列には、前述の GenBank 上に登録されたマウス FUT8 配列とはアミノ酸置換を伴う 3 塩基の不一致があった。以下、本プラスミドを mFUT8-pCR2.1 と称す。

続いて、マウス FUT8 ORF 全長配列を含むプラスミド pBSmFUT8 の構築を以下のように行った (第 26 図)。まず、プラスミド pBluescriptII KS(+) 1 μ g を (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ l を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、

DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。

一方、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 1 μ g を (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRI-EcoRI 断片 (2.9Kb) 1 μ l、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 由来の EcoRI-EcoRI 断片 (1.7Kb) 4 μ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pBSmfFUT8 と称す。

上記 pBSmfFUT8 および pAGE249 を用いて、マウス FUT8 発現ベクター pAGEmfFUT8 の構築を以下の手順で行った (第 27 図)。pAGE249 は、pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 269, 14730 (1994)] の誘導体であり、pAGE248 よりジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) 発現ユニットを含む SphI-SphI 断片 (2.7Kb) を除去したベクターである。

pAGE249 1 μ g を Universel BufferH (宝酒造社製) 50 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液に pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ l を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。

一方、pBSmfFUT8 1 μ g を Universel Buffer H (宝酒造社製) 50 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer

2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、マウス FUT8 cDNA ORF 全長を含む約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pAGE249 由来の BamHI-SalI 断片 (6.5Kb) 1 μ l、プラスミド pBSmfFUT8 由来の BamHI-SalI 断片 (1.7Kb) 4 μ l、Ligation High (東洋紡績社製) 5 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pAGEmfFUT8 と称す。

(2) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

本項 (1) で構築したマウス FUT8 発現ベクター pAGEmfFUT8 を 61-33 株へ導入し、FUT8 遺伝子の安定的発現株を取得した。上記 61-33 株は、抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体を高生産する YB2/0 細胞由来の形質転換細胞 7-9-51 株 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター, FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

プラスミド pAGEmfFUT8 の 61-33 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pAGEmfFUT8 30 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 600 μ l に溶解し、100 単位の制限酵素 EspI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しエタノール沈殿法を行い、回収した線状化プラスミドを 1 μ g/ μ l 水溶液とした。次に、61-33 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na₂HP04、1.5mmol/l KH₂P0₄、4.0mmol/l MgCl₂) に懸濁して 2 \times 10⁷ 個/ml とし、細胞懸濁液 200 μ l (4 \times 10⁶ 個) を上記線状化プラスミド 10 μ l (10 μ g) と混和した。細胞-DNA 混和液を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移した後、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 0.2KV、電気容量 250 μ F の条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を 5% ウシ胎児透析血清 (Life

Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 10ml に混和し、浮遊細胞用 96 穴プレート (Greiner 社製) に 100 μ l ずつ分注した。5%CO₂、37°Cの条件下で 24 時間培養した後、培養上清 50 μ l を除去し、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) を 100 μ l ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性を示す 14 株を取得した。

一方、pAGEmfFUT8 の母骨格ベクターであるプラスミド pAGE249 を 61-33 株へ導入することにより、ネガティブコントロール株を作製した。上述の手順で、制限酵素 *Esp*I により線状化したプラスミド pAGE249 10 μ g をエレクトロポレーション法を用いて 61-33 株 4 \times 10⁶cells へ遺伝子導入した。該細胞を 5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 15ml に混和した後、浮遊細胞用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に移し入れ、5%CO₂、37°Cの条件下で 24 時間培養した。培養後、800rpm で 4 分間の遠心分離を行い、上清の半量 (7.5ml) を除去した後、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) 7.5ml を添加して懸濁し、浮遊細胞用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に移し入れた。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 3 週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性株を取得した。

(3) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株における該遺伝子発現量の解析

本項 (2) で作製した 61-33 株由来マウス FUT8 過剰発現株 14 株より任意に選択した 6 株およびネガティブコントロール株に対し、競合的 RT-PCR を用いて FUT8 発現量の比較を行った。

上記過剰発現株を 0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加

した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 3×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。37°C、5%CO₂ の条件下で 24 時間培養した後、生細胞 1×10^7 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い全 RNA を抽出した。全 RNA を 45 μ l の滅菌水に溶解し、RQ1 Rnase-Free DNase (Promega 社製) 0.5U/ μ l、付属の 10 \times DNase buffer 5 μ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5 μ l を添加して 37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50 μ l の滅菌水に溶解した。

得られた全 RNA 2.5 μ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20 μ l の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、実施例 9 (6) に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量に供した。

各発現株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (2) で調製したラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (4) で調製した YBFT8-pCR2.1 のうち、ラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各発現株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5 μ l および内部コントロール用プラスミド 5 μ l (10fg) を含む総体積 20 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l ラット FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各発現株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5 μ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写

量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には $1\mu\text{g}/\text{ml}$ パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、 β -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各発現株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 β -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

β -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 9 (3) で調製したラット β -アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである YBac-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

β -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 9 (5) で調製した YBac-pBS のうちラット β -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた YBacd-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各発現株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 $5\mu\text{l}$ および内部コントロール用プラスミド $5\mu\text{l}$ (1pg) を含む総体積 $20\mu\text{l}$ の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol}/\text{l}$ dNTPs、 $0.5\mu\text{mol}/\text{l}$ ラット β -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、 94°C で 3 分間の加熱の後、 94°C で 30 秒間、 65°C で 1 分間、 72°C で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各発現株由来 cDNA に代えて、 β -アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 β -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には $1\mu\text{g}/\text{ml}$ パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 3 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 3 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 3 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、 $7\mu\text{l}$ を 1.75% アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分

間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 28 図に β -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株および pAGE249 導入株は、FUT8 転写量が β -アクチン転写量の 0.3~10% であり、FUT8 転写量が比較的低い株であった。一方、mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、FUT8 転写量が β -アクチン転写量の 20~40% であり、FUT8 発現量が比較的高い株であった。

(4) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の精製

本項 (2) で得た FUT8 遺伝子過剰発現株 6 株およびネガティブコントロール株 1 株を、200nmol/l MTX、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、および 0.2% BSA (Life Technologie 社製) を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で浮遊細胞培養用 T225 フラスコ (IWAKI 社製) 3 本に計 100ml 各々播種した。これらを 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で 7~9 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度 (各々 30% 以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、4°C の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4°C の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、0.22 μ m 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清 各 100ml をカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-

0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 50ml で洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を 500 μ l ずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) 100 μ l と混合して中和した。BCA 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分 (計 1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて 4°C で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22 μ m 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

(5) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の *in vitro* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

本項 (4) で精製した抗 GD3 抗体の *in vitro* 細胞傷害活性を評価するため、GD3 陽性細胞であるヒトメラノーマ培養細胞株 G-361 [理化学研究所セルバンク, RCB0991] を用いて ADCC 活性を測定した。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養した G-361 細胞 1×10^6 個を RPMI1640-FBS(10) 500 μ l に懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 3.7MBq を添加して 37°C で 30 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、 2×10^5 個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健常人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2×10^6 個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96 穴U字底プレート (Falcon 社製) の各穴に標的細胞懸濁液を $50\mu\text{l}$ ずつ (1×10^4 個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を $100\mu\text{l}$ ずつ (2×10^5 個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 20:1 とした。次に 10M クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて、本項 (4) で得た各種抗 GD3 抗体より $0.01\mu\text{g/ml}$ 、 $0.1\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 添加することにより、終濃度 $0.0025\mu\text{g/ml}$ 、 $0.025\mu\text{g/ml}$ 、 $0.25\mu\text{g/ml}$ 、 $2.5\mu\text{g/ml}$ とした。 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分の遠心分離を行った。各穴の上清 $50\mu\text{l}$ を 12mm 径 RIA チューブ (IWAKI 社製) に分取し、MINAX-γオートガンマーカウンター5550 (PACKRD 社製) を用いて解離 ^{51}Cr 量の測定を行った。

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10) $150\mu\text{l}$ を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸 $100\mu\text{l}$ および RPMI1640-FBS(10) $50\mu\text{l}$ を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。これらの値を用いて実施例 2 の 2 項 (3) 記載の式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

第 29 図に各種抗 GD3 抗体の G-361 細胞に対する ADCC 活性を示した。第 28 図において FUT8 発現量が低かった mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4 の 3 株は、ネガティブコントロールである pAGE249 株導入株と同等の高い ADCC 活性を示した。一方、第 28 図において FUT8 発現量が高かった mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7 の 3 株は、CHO 細胞より取得した抗 GD3 抗体と同等の低い ADCC 活性を示した。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 発現量を調節することにより、産生抗体の ADCC 活性を調節し得ることが示された。

(6) マウス α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の糖鎖解析

本項 (4) で精製した抗 GD3 抗体の糖鎖解析を行った。mfFUT8-6、pAGE249 株導入株が産生する抗体のヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。減圧留去

することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J.Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った (第 30 図)。ピーク面積から計算すると、mfFUT8-6 の α -1,6-フコースのない糖鎖含量は 10%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は 90%であった。pAGE249 の α -1,6-フコースのない糖鎖含量は 20%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は 80%であった。以上の結果から、FUT8 遺伝子を過剰発現させることにより、産生抗体の α -1,6-フコース結合糖鎖含量が増加することがわかった。

第 30 図は、mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。第 30A 図に mfFUT8-6、第 30B 図に pAGE249 の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5%1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

時間 (分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液 B (%)	0	60	60	0	0

第 30 図と第 31 図で示した (i)~(ix) のピークは、以下の構造を示す。

(i)

$$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1} \\ \quad \searrow^6 \\ \qquad \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc-PA} \\ \quad \nearrow^3 \\ \text{GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1} \end{array}$$

(ii) $\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1$ $\xrightarrow{6}$ $\text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4\text{GlcNAc-PA}$
 $\text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1$ $\xrightarrow{3}$

(iii)

$$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{PA} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$$

(iv)

$$\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow^6 \\ \quad \text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{PA} \\ \quad \nearrow^3 \\ \text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$$

(v)

GlcNAc β 1-2Man α 1-6
Fuc α 1-6
Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA
GlcNAc β 1-2Man α 1-3

[illegible]

(vii)
The diagram shows a central Manose residue linked to three other residues:
- Top left: GlcNAc β 1—2Man α 1
- Bottom left: Gal β 1—4GlcNAc β 1—2Man α 1
- Right: Fuc α 1
Linkages are indicated by numbers 6 and 3.

(viii)

Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA
Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3GlcNAc-PA

(ix)

$$\begin{array}{c} \text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \quad \quad \diagup \\ \quad \quad \quad 6 \quad \quad \quad 3 \\ \text{GlcNAc } \beta 1-4 \text{ Man } \beta 1-4 \text{ GlcNAc } \beta 1-4 \text{ GlcNAc-PA} \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{GlcNAc } \beta 1-2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$$

Fuc α 1
6

GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。第 30 図と第 31 図において、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)~(ix) のうち (i)~(iv) のピークが占める面積、 α -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)~(ix) のうち (v)~(ix) のピークが占める面積から算出した。

実施例 12. CHO 細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の取得

(1) CHO 細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) cDNA 配列の取得

実施例 9 (1) において培養 2 日目の CHO/DG44 細胞より調製した一本鎖 cDNA より、以下の手順でチャイニーズハムスターFUT8 cDNA を取得した (第 32 図)。

まず、マウス FUT8 の cDNA 配列 (GenBank, AB025198) より、5' 側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー (配列番号 21 に示す) および 3' 側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー (配列番号 22 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述の CHO/DG44 細胞由来 cDNA 1 μ l を含む 25 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4%DMSO、0.5 μ mol/l 上記特異的プライマー (配列番号 21 および配列番号 22)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 2Kb を精製した。この DNA 断片 4 μ l を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従ってプラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 8 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入 cDNA が、CHO 細胞 FUT8 の ORF 全長を含む配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを CHfFUT8-pCR2.1 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号 23 に示した。

(2) CHO 細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) ゲノム配列の取得

本項 (1) で取得した CHO 細胞 FUT8 ORF 全長 cDNA 断片をプローブとして用い、CHO-K1 細胞由来 λ -ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE 社製) よりモレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989) 等に記載の公知のゲノムスクリーニングの方法に従い CHO 細胞 FUT8 ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、CHO 細胞 FUT8 cDNA の開始コドンを含む AfaI-Sau3AI 断片 (約 280bp) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうち XbaI-XbaI 断片 (約 2.5Kb) および SacI-SacI 断片 (約 6.5Kb) を選択して pBluescriptII KS(+) (Strategene 社製) へ各々挿入した。

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む上流イントロン約 2.5Kb の配列を、SacI-SacI 断片は CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含む下流イントロン約 6.5Kb の配列を各々コードすることを確認した。以下、XbaI-XbaI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-2、SacI-SacI 断片を含むプラスミドを pFUT8fgE2-4 と称す。決定した CHO 細胞 FUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域の塩基配列 (約 9.0Kb) を配列番号 3 に示した。

実施例 13. α -1,6-フコース転移酵素遺伝子を破壊した CHO 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

CHO 細胞 α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を欠失した CHO 細胞を作製し、該細胞が生産する抗体の ADCC 活性を評価した。

1. チャイニーズハムスター α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン2ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Puro の構築

(1) プラスミド ploxPPuro の構築

以下の手順でプラスミド ploxPPuro を構築した (第 33 図)。

プラスミド pKSelectPuro (Lexicon 社製) 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、特開平 11-314512 に記載のプラスミド ploxP 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 AscI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKSelectPuro 由来の AscI-AscI 断片 (約 1.5Kb) 4.5 μ l、プラスミド ploxP 由来の AscI-AscI 断片 (約 2.0Kb) 0.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、ploxPPuro と称す。

(2) プラスミド pKOFUT8gE2-1 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-2 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-1 を構築した (第 34 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-2 2.0 μ g を、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶

解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS28 (New England Biolabs 社製) 1.0 μ g を、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、制限酵素 SacI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 1.5Kb) 4.5 μ l、プラスミド LITMUS28 由来の EcoRV-SacI 断片 (約 2.8Kb) 0.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-1 と称す。

(3) プラスミド pKOFUT8gE2-2 の構築

本項 (2) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-2 を構築した (第 35 図)。

プラスミド pKOFUT8gE2-1 2.0 μ g を、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、制限酵素 EcoRV (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド ploxPPuro 1.0 μ g を、NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、制限酵素 HpaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 KpnI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-1 由来の EcoRV-KpnI 断片 (約 1.5Kb) 4.0 μ l、プラスミド ploxPPuro 由来の HpaI-KpnI 断片 (約 3.5Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-2 と称す。

(4) プラスミド pscFUT8gE2-3 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pscFUT8gE2-3 を構築した (第 36 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0 μ g を NEBuffer 1 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HpaII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、Blunting High (東洋紡社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った。フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行って DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.5Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド LITMUS39 (New England Biolabs 社製) 1.0 μ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRV (New

England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.8Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HpaII-HindIII 断片 (約 3.5Kb) 4.0 μ l、プラスミド LITMUS39 由来の EcoRV-HindIII 断片 (約 2.8Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pscFUT8gE2-3 と称す。

(5) プラスミド pKOFUT8gE2-3 の構築

実施例 12 (2) で得たチャイニーズハムスターFUT8 のエクソン 2 を含むゲノム領域を有するプラスミド pFUT8fgE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-3 を構築した (第 37 図)。

プラスミド pFUT8fgE2-4 2.0 μ g を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 1.8Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) (Stratagene 社製) 1.0 μ g を NEBuffer for EcoRI (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 EcoRI (New England Biolabs 社製) および 20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.0Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pFUT8fgE2-4 由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 1.8Kb) 4.0 μ l、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の HindIII-EcoRI 断片 (約 3.0Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアン

ピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-3 と称す。

(6) プラスミド pKOFUT8gE2-4 の構築

本項 (4) および (5) で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 および pKOFUT8gE2-3 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-4 を構築した (第 38 図)。

プラスミド pscFUT8gE2-3 1.0 μ g を、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 3.6Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-3 1.0 μ g を、100 μ g/ml BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 HindIII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 35 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5 μ l を添加し、65°C で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。

上記で得たプラスミド pscFUT8gE2-3 由来の SalI- HindIII 断片 (約 3.1Kb) 4.0 μ l、プラスミド pKOFUT8gE2-3 由来の SalI- HindIII 断片 (約 4.8Kb) 1.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-4 と称す。

(7) プラスミド pKOFUT8gE2-5 の構築

本項 (3) および (6) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 および pKOFUT8gE2-4 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8gE2-5 を構築した (第 39 図)。

プラスミド pKOFUT8gE2-2 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、制限酵素 SmaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 25°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0 μ l を添加し、65°C で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-4 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、制限酵素 SmaI (New England Biolabs 社製) 20 単位を加えて 25°C で 2 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 30 μ l に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 5.2Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得たプラスミド pKOFUT8gE2-2 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.0Kb) 0.5 μ l、プラスミド pKOFUT8gE2-4 由来の SmaI-BamHI 断片 (約 5.4Kb) 4.5 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 15 時間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8gE2-5 と称す。

(8) プラスミド pKOFUT8Puro の構築

本項 (7) で得たプラスミド pKOFUT8gE2-5 を用いて、以下の手順でプラスミド pKOFUT8Puro を構築した (第 40 図)。

プラスミド pKOSelectDT (Lexicon 社製) 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50 μ l に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、該液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、ジフテリアトキシン発現ユニットを含む約 1.2Kb の DNA 断片を精製した。

一方、プラスミド pKOFUT8gE2-5 1.0 μ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 50 μ l に溶解し、制限酵素 RsrII (New England Biolabs 社製) 16 単位を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行った。消化反応後、pH8.0 の 1mol/l Tris-HCl 緩衝液 30 μ l および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.0 μ l を添加し、65°C で 1 時間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した DNA 断片を滅菌水 10 μ l に溶解した。

上記で得たプラスミド pKOSelectDT 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 1.2Kb) 1.0 μ l、プラスミド pKOFUT8gE2-5 由来の RsrII-RsrII 断片 (約 10.4Kb) 1.0 μ l、滅菌水 3.0 μ l、Ligation High (東洋紡社製) 5.0 μ l を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。本プラスミドを以下、pKOFUT8Puro と称す。

2. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子エクソン 2 を含むゲノム領域を 1 コピー破壊した CHO 細胞の作製

(1) ターゲティングベクターの導入

本実施例第 1 項で構築したチャイニーズハムスターFUT8 ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Puro を実施例 8 の 1(2) で作製した 5-03 株へ導入した。

プラスミド pKOFUT8Puro の 5-03 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行

った。まず、プラスミド pKOFUT8Puro 150 μ g を NEBuffer for SalI (New England Biolabs 社製) 1.8ml に溶解し、600 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 5 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1 μ g/ μ l 水溶液とした。一方、5-03 株を K-PBS 緩衝液 (137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na₂HP0₄、1.5mmol/l KH₂PO₄、4.0mmol/l MgCl₂) に懸濁して 8 \times 10⁷ 個/ml とした。細胞懸濁液 200 μ l (1.6 \times 10⁶ 個) を上記線状化プラスミド 4 μ l (4 μ g) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250 μ F の条件で遺伝子導入を行った。同様にし、キュベット 30 本分に対し遺伝子導入した後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 30 枚へ播種した。5%CO₂、37°C の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、15 μ g/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性株を取得した。

(2) ターゲティングベクター導入株の取得

本項 (1) で得たピューロマイシン耐性株より任意の 900 個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、ピューロマイシン耐性株が出現した 10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、15 μ g/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地 (20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM) と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。レプリカプレートは、15 μ g/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

(3) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (2) で得た 900 クローンに対し、以下の手順でゲノム PCR による相同組換えの診断を行った。

まず、本項 (2) で作製したレプリカプレートより公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 μ g/ml RNase A) 30 μ l に一晩溶解した。また、実施例 12. で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 26 に示す) およびベクター内の loxP 配列に結合するプライマー (配列番号 27 に示す) を設計した。

DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々 10 μ l 含む 25 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 μ mol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 26 および配列番号 27)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした 38 サイクルの条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、CHO 細胞ゲノム領域とターゲティングベクター相同領域との境界部を含む約 1.7Kb の特異的増幅が認められるものを陽性クローンとした。本法により陽性を示す 1 クローンを見出した。

(4) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項 (3) で陽性が確認された 1 クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、本項 (3) で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO₂、37°Cの条件下で 10 分間静置した。静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。15 µg/ml Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 µg/ml RNase A) 150 µl に一晚溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12 µg を NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製) 120 µl に溶解し、25 単位の制限酵素 PstI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で一晚消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20 µl に溶解し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、実施例 12 で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 28 および配列番号 29) を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 12 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20 µl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 µmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 28 および配列番号 29)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした

25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5 μ l に対し、[α -³²P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5 \times SSPE、50 \times Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/ml サケ精子 DNA] 15ml を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65°C で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65°C で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 *Pst*I 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 4.4Kb の DNA 断片が生じる。一方、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 6.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、本項 (3) における陽性クローンのゲノム DNA より上記約 4.4Kb および約 6.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1:1 であったことから、本クローンは、FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊したクローンであることが確認された。本クローンを以下、1st. Δ FUT8 2-46 株と称す。

3. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子を 1 コピー破壊した CHO 細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例第 2 項で作製した 1st. Δ FUT8 2-46 株へ、Cre リコンビナーゼ発現ベクター-pBS185 (Life Technologies 社製) を導入した。

プラスミド pBS185 の 1st. Δ FUT8 2-46 株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、1st. Δ FUT8 2-46 株を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l

NaCl、8.1mmol/l Na_2HPO_4 、1.5mmol/l KH_2PO_4 、4.0mmol/l MgCl_2] に懸濁して 8×10^7 個/ml とした。細胞懸濁液 200 μl (1.6×10^6 個) をプラスミド pBS185 4 μg と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250 μF の条件で遺伝子導入を行った。導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) 10ml に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5% CO_2 、37°C の条件下で 24 時間培養した。培養後、上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を 10ml ずつ分注した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 10 日間の培養を行った。

(2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項 (1) で得た株より任意の 400 個のコロニーを以下の手順で採取した。

まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7ml を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地 (20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM) と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートを作製する一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

次に、レプリカプレートを 15 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 6 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれ

たピューロマイシン耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、ピューロマイシン存在下で死滅する。本選択法により 91 個の陽性クローンを見出した。

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項 (2) で見出された陽性クローンのうち任意の 6 クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項 (2) で凍結保存したマスタープレートのうち、上記 6 クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5%CO₂、37°Cの条件下で 10 分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200μg/ml RNase A) 150μl に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12μg を NEBuffer for BamHI (New England Biolabs 社製) 120μl に溶解し、20 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°Cで一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA) 20μl に溶解し、0.4% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683 (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°Cで 2 時間の熱処理を行った。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、実施例 12 で得た FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 30 および配列番号 31) を設計した。次に、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 12 (2) で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20μl の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5μmol/l 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 30 および配列番号 31)]

を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は、94°Cで 1 分間の加熱の後、94°Cで 30 秒間、55°Cで 30 秒間、74°Cで 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5 μ l に対し、[α -³²P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 (5 \times SSPE、50 \times Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μ g/ml サケ精子 DNA) 15ml を加えて 65°Cで 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、³²P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°Cで一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65°Cで 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2 \times SSC-0.1% (w/v) SDS 50ml に浸漬し、65°Cで 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ-80°Cで二晩暴露し現像した。

前述の制限酵素 BamHI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 19.0Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 12.5Kb の DNA 断片が生じる。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去された場合には、同処理により約 11.0Kb の DNA 断片が生じる。

本法により、上記 6 クローンのうち 5 クローンのゲノム DNA より上記約 19.0Kb および約 11.0Kb の特異的断片が見出された。両断片の量比が 1:1 であったことから、FUT8 ゲノム領域を 1 コピー破壊した株よりピューロマイシン耐性遺伝子が除去されたことが示された。本クローンを以下、1st. Δ FUT8 2-46-1 株と称す。尚、上述の 1st. Δ FUT8 2-46-1 株、1st. Δ FUT8 2-46 株、及び、5-03 株のゲノムサザンの結果を第 41 図に示した。なお 1st. Δ FUT8 2-46-1 株は 2-46-1 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6) に FERM BP-7755 として寄託されている。

4. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体の精製

本実施例第 3 項で得た FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊した株 1st. Δ FUT8 2-46-1 株を、 3×10^5 個/ml の密度で $15 \mu\text{g/ml}$ Puromycin (SIGMA 社製) および 10% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) へ懸濁後、接着細胞培養用 T182 フラスコ (Greiner 社製) 2 本に計 60ml 各々播種した。3 日間の培養後、上清を除去し、EXCELL301 培地 (JRH Biosciences 社製) 計 60ml へ交換した。

これらを 37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度 (各々 30% 以下) であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し 3000rpm、 4°C の条件で 10 分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、 4°C の条件で 1 時間の遠心分離を行った後、 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径 150ml 容 PES Filter Unit (NALGENE 社製) を用いて濾過した。

0.8cm 径のカラムに Prosep-A HighCapacity (bioPROCESSING 社製) を厚さ 2cm で充填し、 0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10ml および 1mol/l グリシン/NaOH- 0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 10ml で順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清各 100ml をカラムに通塔し、 1mol/l グリシン/NaOH- 0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH8.6) 50ml で洗浄した。洗浄後、 0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5ml を用いて Prosep-A に吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を $500 \mu\text{l}$ ずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ 2mol/l Tris-HCl (pH8.5) $100 \mu\text{l}$ と混合して中和した。BCA 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む 2 画分 (計 1.2ml) を選択して合一し、 10mol/l クエン酸- 0.15mol/l NaCl 緩衝液 (pH6.0) を用いて 4°C で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径 Millex GV (MILLIPORE 社製) を用いて滅菌濾過した。

5. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子破壊株が産生する抗体の in vitro 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

本実施例第 4 項で精製した抗 CCR4 抗体の in vitro 細胞傷害活性を評価するため、実施例 8 に記載の CCR4 陽性細胞株 CCR4/EL-4 を用いた ADCC 活性を行った。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie 社製) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologie 社製) (以下、RPMI1640-FBS(10) と略記する) で継代培養した CCR4/EL-4 株 1×10^6 個を RPMI1640-FBS(10) 500 μ l に懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 3.7MBq を添加して 37°C で 90 分間培養することにより、細胞の放射線標識を行った。1200rpm で 5 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞を RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で 30 分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5ml に懸濁することにより、 2.0×10^5 個/ml の標的細胞懸濁液を調製した。

一方、健常人の静脈血 30ml を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5ml を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30ml と混合した。混合後、各 10ml をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4ml 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30ml に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20ml に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて 2.5×10^6 個/ml のエフェクター細胞懸濁液を調製した。

96 穴 U 字底プレート (Falcon 社製) の各穴に標的細胞懸濁液を 50 μ l ずつ (1×10^4 個/穴) 分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を 100 μ l ずつ (2.5×10^5 個/穴) 分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を 25:1 とした。次に RPMI1640-FBS(10) を用いて、本実施例第 5 項で得た各抗 CCR4 抗体より 0.01 μ g/ml、0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに 50 μ l 添加することにより、終濃度 0.0025 μ g/ml、0.025 μ g/ml、0.25 μ g/ml、2.5 μ g/ml とした。5% CO_2 、37°C の条件下で 4 時間反応させた後、プレートに対し 1200rpm で 5 分の遠心分離を行った。各穴の上清 75 μ l を 12mm 径 RIA チューブ (IWAKI 社製) に分取し、MINAX- α オートガンマカウンター 5550 (PACKARD 社製) を用いて解離 ^{51}Cr 量の測定を行った。

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて RPMI1640-FBS(10) 150 μ l を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて 1 規定 塩酸 100 μ l および

RPMI1640-FBS(10) 50 μ l を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 ^{51}Cr 量の値を求めた。これらの値を用いて前記式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

第 42 図に各種抗 CCR4 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 対立遺伝子を 1 コピー破壊した 1st. Δ FUT8 2-46-1 株より得た抗体は、該遺伝子破壊前の CHO 細胞 5-03 株が産生する抗体に比べ有意に高い ADCC 活性を示した。また、これら抗体での抗原結合活性には変化は観察されなかった。以上の結果より、宿主細胞の FUT8 対立遺伝子を破壊することにより、産生抗体の ADCC 活性を向上し得ることが確認された。

実施例 14. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

(1) レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

CHO/DG44 細胞を、IMDM-FBS(10) 培地 [ウシ胎児血清 (FBS) を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度含む IMDM 培地] にて接着培養用フラスコ 75cm² (グライナー社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5ml のダルベッコ PBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、ダルベッコ PBS で希釈した 0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を 1.5ml 添加して 37°C にて 5 分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、 1×10^5 細胞/ml の密度になるように IMDM-FBS(10) 培地を添加して懸濁後、未添加又は 0.1 μ g/ml のアルキル化剤である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNG と表記、Sigma 社製) を添加した。CO₂ インキュベータ (TABAI 製) 内で 37°C にて 3 日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10) 培地に懸濁後、接着培養用 96 穴プレート (岩城硝子社製) に 1000 細胞/ウェルの密度で播種した。各ウェルには培地中終濃度で 1mg/ml のレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCA と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/ml のヒイロチャワントケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AAL と表記、Vector 社製)、あるいは 1mg/ml のインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHA と表記、Vector 社製) を添加した。CO₂ インキュベータ内で 37°C にて 2 週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性 CHO/DG44 株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性 CHO/DG44 株については、LCA 耐性株を CHO-LCA 株、AAL 耐性株を CHO-AAL 株、L-PHA

耐性株を CHO-PHA 株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA 株は AAL に対しても耐性であり、CHO-AAL 株は LCA に対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は、LCA や AAL が認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン残基の 6 位とフコースの 1 位が α 結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度 1mg/ml のエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin; 以下、PSA と表記、Vector 社製) が添加された培地でも CHO-LCA 株及び CHO-AAL 株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤 MNNG 無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、それら株を解析に用いた。

(2) 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞の作製

上記 (1) で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、実施例 8 に記載した方法で、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて行い、CHO-LCA 株、CHO-AAL 株、CHO-PHA 株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-LCA 株、CHO-AAL 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-AAL 株、CHO-PHA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-PHA 株と名付けた。なお CHO/CCR4-LCA 株は Nega-13 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6) に FERM BP-7756 として寄託されている。

(3) レクチン耐性 CHO 細胞による高 ADCC 活性抗体の生産

上記 (2) で得られた 3 種類の形質転換株を用い、実施例 8 の 3 に記載した方法で精製抗体を取得した。各抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の抗原結合活性は実施例 8 の 2 に記載した ELISA 法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例 8 で作製した通常の CHO/DG44 細胞を宿主とした組換え細胞株 (5-03 株) が生

産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例 8 の 7 に記載した方法にしたがって各抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の ADCC 活性を評価した。その結果を図 43 に示した。5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株及び CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、約 100 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体では有意な ADCC 活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA 株と YB2/0 株が生産した抗体の ADCC 活性を実施例 8 の 7 に記載した方法にしたがって比較したところ、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体は実施例 8 の 1 で作製した YB2/0 細胞株が生産した抗体 KM2760-1 と同様に、5-03 株が生産した抗体に比べ高い ADCC 活性を示すことが明らかとなった (第 44 図)。

(4) レクチン耐性 CHO 細胞が生産する抗体の糖鎖解析

上記 (3) で精製した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の糖鎖解析を行った。精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー-0.5-10K (ミリポア社製) を用いて 10mM KH_2PO_4 に溶液を置換した。置換倍率は 80 倍以上になるように行なった。置換した抗体は、UV-1600 (島津社製) を用いて濃度を測定した。抗体のアミノ酸配列から式 (III) [アドバンス・イン・プロテインケミストリー (Advances in Protein Chemistry), 12, 303, 1962] を用いてモル吸光定数を算出し、280nm の吸光度 1.0 を 1.38mg/ml として濃度を決定した。

$$E_{1\text{mol/l}} = A \times n1 + B \times n2 + C \times n3 \quad (\text{III})$$

$$E_{1\text{mol/ml}} = E_{1\text{mol/l}} / \text{MW}$$

$E_{1\text{mol/l}}$: 280nm での吸光係数 ($\text{mg}^{-1} \text{ml cm}^{-1}$)

$E_{1\text{mol/ml}}$: 280nm でのモル吸光係数 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

A: トリプトファンの 280nm でのモル吸光係数 = 5550 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

B: チロシンの 280nm でのモル吸光係数 = 1340 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

C: シスチンの 280nm でのモル吸光係数 = 200 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

n1: 抗体 1 分子あたりのトリプトファンの数

n2: 抗体 1 分子あたりのチロシンの数

n3: 抗体 1 分子あたりのシスチンの数

MW: 抗体の分子量 (g/mol)

100 μ g の抗体をヒドラクラブ S-204 用 Test tube に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固させた Test tube をホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110°C、1 時間反応させた [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。Test tube にホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250 μ l、無水酢酸を 25 μ l 入れてよく攪拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent を 250 μ l、無水酢酸を 25 μ l 加えてよく攪拌させ、室温で 1 時間反応させた。試料を -80°C のフリーザーで凍結させ、約 17 時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa 社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984]。2-アミノピリジン溶液は 2-アミノピリジン 1g に対し HCl 760 μ l を加え (1 \times PA 溶液)、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に希釈したものを用了 (10 倍希釈 PA 溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1 \times PA 溶液 20 μ l、逆浸透精製水 430 μ l を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67 μ l 入れて 100°C、15 分反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2 μ l 入れて 90°C、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mM 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5ml/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製、 ϕ 6.0mm \times 150mm) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55°C、流速は 1ml/ml、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分間溶出した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS 分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖

スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった (第 45 図)。糖鎖含量は、逆相 HPLC 分析における各 PA 化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端が N-アセチルグルコサミンでない PA 化糖鎖は、不純物由来であるか、PA 化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。

緩衝液 A としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8)、緩衝液 B としてリン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) + 0.5% 1-ブタノールを用い、実施例 11 の (6) と同様に分析した。

第 45 図において、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、(i)~(viii) のうち (i)~(iv) のピークが占める面積、 α -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、(i)~(viii) のうち (v)~(viii) のピークが占める面積から算出した。

レクチン耐性株が生産する抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体精製標品の糖鎖構造を分析した結果を第 6 表に示した。ここで、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体の糖鎖を分析した結果を示したものである。実施例 d (4) に記載した方法で分析しピークの面積から計算した、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合 (%) を表に示す。

第 6 表

抗体の生産細胞	α -1,6-フコースを持たない複合二本鎖型糖鎖 (%)
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体では、分析ピークの面積から計算すると、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から27%まで上昇していた。一方、PHA 耐性株では 5-03 株

と比較して、糖鎖パターン及び α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

実施例 15. レクチン耐性 CHO 細胞株の解析

1. 抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における GMD 酵素の発現量解析

実施例 14 で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA における、フコース生合成酵素として知られる GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase)、GFPP (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase)、FX (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)、及びフコース転移酵素である FUT8 (α -1,6-fucosyltransferase) の各遺伝子の発現量を、RT-PCR 法を用いて解析した。

(1) 各種細胞株からの RNA 調製

CHO/DG44 細胞、実施例 8 の 1(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 5-03、実施例 14(2) で取得した抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA をそれぞれ 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内にて継代後 4 日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各 1×10^7 細胞より添付の使用説明書に従って RNA を調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL 社製) を用い、添付の使用説明書に従って各 RNA 5 μ g より 20 μ l の反応液中にて一本鎖 cDNA を合成した。

(2) RT-PCR 法を用いた GMD 遺伝子の発現量解析

GMD cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 17 の 1 で示す CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 32 で示される塩基配列を有する 24mer の合成 DNA プライマーと配列番号 33 で示される塩基配列を有する 26mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 32 と 33 の合成 DNA プライマ

ー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 350bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

(3) RT-PCR 法を用いた GFPP 遺伝子の発現量解析

GFPP cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 2 で取得した CHO 細胞由来 GFPP の cDNA 配列に基づいて、配列番号 34 で示される塩基配列を有する 27mer の合成 DNA プライマーと配列番号 35 で示される塩基配列を有する 23mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 34 と 35 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 24 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

(4) RT-PCR 法を用いた FX 遺伝子の発現量解析

FX cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 16 の 1 で取得した CHO 細胞由来 FX の cDNA 配列に基づいて、配列番号 36 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーと配列番号 37 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 36 と 37 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、

94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 300bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(5) RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5 μ M の配列番号 13 と 14 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(6) RT-PCR 法を用いた β -アクチン遺伝子の発現量解析

β -アクチン cDNA を PCR 法によって増幅するために、本項 (1) で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer（宝酒造社製）、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase（宝酒造社製）、0.5 μ M の配列番号 15 と 16 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 14 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10 μ l をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン（BMA 社製）を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 800bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI（モレキュラーダイナミクス社製）を用いて測定した。

(7) 各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 遺伝子の発現量

本項 (2) から (6) で測定した各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値を、各細胞株における β -アクチンの cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値で割り、CHO/DG44 細胞における PCR 増幅断片量を 1 とした場合の 5-03 株及び CHO/CCR4-LCA 株における各遺伝子の PCR 増幅断片量を求めた。結果を第 7 表に示す。

第 7 表

	GMD	GFPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞	0.160	0.886	0.920	0.875
CHO/CCR4-LCA				

第 7 表で示したように CHO/CCR4-LCA 株の GMD 遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ 1/10 程度に低下していた。なお、本実験は独立して 2 回行い、その平均値を使用した。

2. GMD 遺伝子を強制発現させた抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA を用いた解析

(1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の構築

実施例 17 の 1 で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 38 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、及び配列番号 39 で示される塩基配列を有する 29mer のプライマーを作製した。続いて、本実施例 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来 GMD 一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 38 と 39 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラ

ー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、58°Cにて 1 分間、72°Cにて 1 分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 600bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド mt-C を得た (第 46 図参照)。

次に、実施例 17 の 1 で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 40 で示される塩基配列を有する 45mer のプライマー、及び配列番号 41 で示される塩基配列を有する 31mer のプライマーを作製した。続いて、本実施例 1 項(1) で作製した CHO 細胞由来 GMD 一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 40 と 41 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後 94°Cにて 1 分間、57°Cにて 1 分間、72°Cにて 1 分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94°Cにて 1 分間、68°Cにて 2 分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 150p の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ATG を得た (第 47 図参照)。

次に、実施例 17 の 1 で作製した 3 μ g のプラスミド CHO-GMD を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37°Cにて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°Cにて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約 900bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。1.4 μ g のプラスミド mt-C を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37°Cにて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社

製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3.1kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) を得た (第 48 図参照)。

次に、2 μ g のプラスミド WT-N(-) を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。3 μ g のプラスミド pBluescriptSK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) in pBS を得た (第 49 図参照)。

次に、2 μ g のプラスミド WT-N(-) in pBS を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 μ g のプラスミド ATG を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、プラスミド WT in pBS を得た (第 50 図参照)。

次に、 $2\mu\text{g}$ のプラスミド pAGE249 を制限酵素 *Hind*III と *Bam*HI (共に宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 6.5kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。 $2\mu\text{g}$ のプラスミド WT in pBS を制限酵素 *Hind*III と *Bam*HI (共に宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1.2kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、プラスミド pAGE249GMD を得た (第 51 図参照)。

(2) CHO/CCR4-LCA における GMD 遺伝子の安定発現

制限酵素 *Esp*I (NEW ENGLAND BIOLABS 社製) で切断することにより直鎖状とした CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD を $5\mu\text{g}$ 、 1.6×10^6 細胞の CHO/CCR4-LCA 株へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、MTX (SIGMA 社製) を 200nM の濃度で含む 30ml の IMDM-dFBS(10) 培地を 10%含む IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製) に懸濁し、 182cm^2 フラスコ (Greiner 社製) にて 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml、MTX (SIGMA 社製) を 200nM の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に培地交換してさらに 19 日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

また同様に、pAGE249 ベクターを上記と同じ方法で CHO/CCR4-LCA 株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

(3) GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の培養及び抗体の精製

本項 (2) で取得した GMD を発現している形質転換細胞群を MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地を用いて、 182cm^2 フラスコ (Greiner 社製) にて 37°C の 5%CO₂ インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25ml の PBS バッファー (GIBCO BRL 社製) にて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を

35ml 注入した。37°Cの 5%CO₂ インキュベーター内で 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗 CCR4 キメラ抗体を回収、精製した。

(4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

本項 (2) で取得した GMD 遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 6×10^4 細胞/ml になるように懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 50 μ l/ウェルずつ分注した。続いて、このウェルに MTX (SIGMA 社製) を 200nM、ハイグロマイシンを 0.5mg/ml の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地に 0mg/ml、0.4mg/ml、1.6mg/ml、4mg/ml の濃度で LCA (LENS CULINARIS AGGLUTININ : Vector Laboratories 社製) を懸濁した培地を 50 μ l ずつ加え、37°Cの 5%CO₂ インキュベーター内で 96 時間培養した。培養後、WST-I (ベーリンガー社製) を 10 μ l/ウェルになるよう加え、37°Cの 5%CO₂ インキュベーター内で 30 分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) にて 450nm と 595nm の吸光度 (以下 OD450、OD595 と表記する) を測定した。また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して 2 回行なった。

上記で測定した OD450 から OD595 を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCA を加えていないウェルの細胞生存数を 100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を%で表記し第 52 図に示した。第 52 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株では LCA 耐性度の低下が観察され、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 40%程度、0.8mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 20%程度であった。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株では、0.2mg/ml の LCA 存在下での細胞生存率は 100%、0.8mg/ml の LCA 存在下においても細胞生存率は 80%程度であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 LCA に対する耐性を獲得していることが示唆された。

(5) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性 (ADCC 活性)

本項 (3) で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC 活性を測定した。

i) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地に $500\mu\text{g/ml}$ の濃度で G418 硫酸塩 (ナカライテスク製) を添加した培地で培養した CCR4-EL4 株 (実施例 8 の 7 参照) の 1×10^6 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 90 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁及び遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5ml 加え、 2.5×10^5 細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

ii) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50ml を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5ml を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて 2×10^6 細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

iii) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 1) で調製した標的細胞溶液の $50\mu\text{l}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで 2) で調製したエフェクター細胞溶液を $100\mu\text{l}$ (2×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体 (本項 (3) で精製した抗 CCR4 キメラ抗体、及び KM2760-1、KM3060) を最終濃度 $0.0025\sim 2.5\mu\text{g/ml}$ となるように加え、 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の ^{51}Cr 量を γ -カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の

代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式 (II) により求めた。

ADCC 活性測定の結果を第 53 図に示した。第 53 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、実施例 8 で取得した KM3060 と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と同程度の ADCC 活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 ADCC 活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

(6) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株由来の抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析

本項 (3) で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖解析を実施例 14 (4) に示す方法に従って行ない、その解析結果を第 55 図に示した。実施例 14 で作製した CHO/CCR4-LCA より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と比較して、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体では、分析ピークの面積から計算すると α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 9% に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA 株に GMD 遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の α -1,6-フコースを持たない糖鎖の割合が 5-03 株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

実施例 16. CHO 細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

1. CHO 細胞の FX cDNA 配列の決定

(1) CHO/DG44 細胞由来全 RNA の抽出

CHO/DG44 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 2×10^5 個/ml の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15ml 播種した。37°C の 5% CO_2 インキュベーター内で培養し、培養

2 日目に 1×10^7 個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

(2) CHO/DG44 細胞由来全一本鎖 cDNA の調製

上記 (1) で調製した全 RNA を $45 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) $1 \mu\text{l}$ 、付属の $10 \times$ DNase buffer $5 \mu\text{l}$ 、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) $0.5 \mu\text{l}$ をそれぞれに添加して、 37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、 $50 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA $3 \mu\text{l}$ に対し SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした $20 \mu\text{l}$ の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。GFPP および FX のクローニングには該反応液の 50 倍希釈水溶液を使用した。使用するまで -80°C で保管した。

(3) チャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒト FX の cDNA (Genebank 登録番号 U58766) およびマウスの cDNA (Genebank 登録番号 M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 42 および配列番号 43 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 (2) で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を $1 \mu\text{l}$ を含む $25 \mu\text{l}$ の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、 0.2mM dNTPs、 $0.5 \mu\text{mol/l}$ 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 42 および配列番号 43)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94°C で 5 分間の加熱の後、 94°C で 1 分、 58°C で 2 分間、 72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 301bp を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 $20 \mu\text{l}$ で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増

幅断片 4 μ l を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A)、69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる) に従って、プラスミド DNA を単離し、FX cDNA 部分断片が組み込まれた 2 クローンを得た。各々 pCRFX クローン 8、pCRFX クローン 12 と称す。

FX クローン 8、FX クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー-377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの FX のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。

(4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

本項 (1) で抽出した CHO/DG44 全 RNA からの 5' および 3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただし PowerScriptTM Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

(5) RACE 法によるチャイニーズハムスターFX 全長 cDNA の決定

上記 (3) 項で決定したチャイニーズハムスターFX の部分配列をもとにチャイニーズハムスターFX に特異的な 5' RACE 用プライマー FXGSP1-1 (配列番号 44) および FXGSP1-2 (配列番号 45)、チャイニーズハムスターFX 特異的な 3' RACE 用プライマー FXGSP2-1 (配列番号 46) および FXGSP2-2 (配列番号 47) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/D G44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA を $1\mu\text{l}$ を含む $50\mu\text{l}$ の反応液 [Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、 0.2mM dNTPs、 $0.2\mu\text{mol/l}$ チャイニーズハムスターFX 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94°C で 5 秒間、 68°C で 10 秒間、 72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より $1\mu\text{l}$ をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 $1\mu\text{l}$ をテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 8 表に示した。

第 8 表
チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCR に用いた
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp
3' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

PCR 後、反応液を 1% アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 $20\mu\text{l}$ で溶出した。上記増幅断片 $4\mu\text{l}$ を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターFX の 5' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を FX5' クローン 25、FX5' クローン 26、FX5' クローン 27、FX5' クローン 28、FX5' クローン 31、FX5' クローン 32 と称す。

同様にチャイニーズハムスターFX の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々 FX3' を FX3' クローン 1、FX3' クローン 3、FX3' クローン 6、FX3' クローン 8、FX3' クローン 9 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シーケンサー377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFXcDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号 48) に示す。

2. CHO 細胞の GFPP cDNA 配列の決定

(1) チャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片を取得した。まず公的データベースに登録されているヒト GFPP の cDNA (Genebank 登録番号 AF017445)、該配列と相同性の高いマウス EST 配列 (Genebank 登録番号 AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、および Rat EST 配列 (Genebank 登録番号 BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3 種間で保存性の高い領域にラット GFPP に特異的なプライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、本項 1 (2) で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を 1 μ l を含む 25 μ l の反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTPs、0.5 μ mol/l 上記 GFPP 特異的プライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR は 94°C で 5 分間の加熱の後、94°C で 1 分、58°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1.4Kbp を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20 μ l で溶出した。上記増幅断片 4 μ l を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、GFPP cDNA 部分断片が組み込まれた 3 クローンを得た。各々 GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 と称す。

GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの GFPP のオープンリーディングフレーム (ORF) の部分配列をコードすることを確認した。

(2) RACE 法によるチャイニーズハムスター GFPP 全長 cDNA の決定

本項 2 (1) で決定したチャイニーズハムスター FX の部分配列をもとにチャイニーズハムスター FX に特異的な 5' RACE 用プライマー GFPP GSP1-1 (配列番号 52) および GFPP GSP1-2 (配列番号 53)、チャイニーズハムスター GFPP 特異的な 3' RACE 用プライマー GFPP GSP2-1 (配列番号 54) および GFPP GSP2-2 (配列番号 55) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、本項 (4) で調製した CHO/DG44 由来 RACE 用一本鎖 cDNA $1\mu\text{l}$ を含む $50\mu\text{l}$ の反応液 [Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、 0.2mM dNTPs、 $0.2\mu\text{mol/l}$ チャイニーズハムスター GFPP 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

PCR は 94°C で 5 秒間、 68°C で 10 秒間、 72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より $1\mu\text{l}$ をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 $1\mu\text{l}$ をテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 9 表に示した。

第9表

チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCR に用いた
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

3' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM(Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP(Nested Univarsal primer)	1400bp

PCR 後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水 20 μ l で溶出した。上記増幅断片 4 μ l を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換した。

得られた複数のカナマイシン耐性コロニーから、プラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターGFPP の 5' 領域を含む cDNA4 クローンを得た。各々を GFPP5' クローン 1、GFPP5' クローン 2、GFPP5' クローン 3、GFPP5' クローン 4 と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPP の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を GFPP3' クローン 10、GFPP3' クローン 16、GFPP3' クローン 20 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 (配列番号 51) に示す。

実施例 17. CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の取得

1. CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列の決定

(1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の cDNA 取得 (5' 及び 3' 末端配列を除く部分 cDNA の取得)

GenBank に登録されているヒト GMD cDNA 配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来 GMD cDNA を公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3 種類のマウス EST 配列が得られた (GenBank Accession No. BE986856、BF158988、BE284785)。これら EST 配列を連結させることにより、推定されるマウス GMD cDNA 配列を決定した。

このマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 56 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、配列番号 57 で示される塩基配列を有する 27mer のプライマー、配列番号 58 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、配列番号 59 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、配列番号 60 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。

続いて、CHO 細胞由来 GMD cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の合成 DNA プライマー 2 種類] を調製した。なお、合成 DNA プライマーには配列番号 56 と配列番号 57、配列番号 58 と配列番号 57、配列番号 56 と配列番号 59、配列番号 56 と配列番号 60 の組み合わせを用いた。該反応液を DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて 94°C にて 5 分間加熱した後、94°C にて 1 分間、68°C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.2kbp、配列番号 57 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.1kbp、配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 350bp、配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1kbp の DNA 断片が増幅された。これら DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 22-8 (配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.2kbp の DNA 断片を有する)、23-3 (配列番

号 58 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.1kbp の DNA 断片を有する)、31-5 (配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーから増幅された約 350bp の DNA 断片を有する)、34-2 (配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1kbp の DNA 断片を有する) を得た。これらプラスミドに含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列を、DNA シークエンサーABI PRISM 377 (パーキンエルマー社製) を用い、常法に従って決定した (5' 末端側の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列、及び 3' 末端側の終了コドンより上流 27 塩基の配列は合成オリゴ DNA 配列由来のため、マウス GMD cDNA 配列である)。

さらに、プラスミド 22-8 と 34-2 に含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA を組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。1 μ g のプラスミド 22-8 を制限酵素 *Eco*RI (宝酒造社製) で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。2 μ g のプラスミド 34-2 を制限酵素 *Eco*RI で 37°C にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。それぞれ回収した DNA 断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド CHO-GMD を得た (第 54 図参照)。

(2) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 5' 末端配列の決定

CHO 細胞由来ヒト及びマウス GMD cDNA の 5' 末端側非コード (non-coding) 領域の塩基配列より配列番号 61 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、及び CHO 由来 GMD cDNA 配列より配列番号 62 で示される塩基配列を有する 32mer のプライマーを作製し、cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 15 の 1 項 (1) で得られた CHO 細胞由来の一本鎖 cDNA 0.5 μ l を鋳型として含む 20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM の dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 61 と配列番号 62 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、

94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間のサイクルを20サイクル行なった後、さらに94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを18サイクル行なった。該PCR反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約300bpのDNA断片をGene Clean II kit (BI0101社製)を用い、添付の説明書に従って回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit (宝酒造社製)を用いてpT7Blue(R)ベクター (Novagen社製)に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株 (東洋紡績社製)を形質転換し、プラスミド5'GMDを得た。DNAシーケンサー377 (パーキンエルマー社製)を用い、該プラスミドに含まれるCHO由来GMD cDNAの開始メチオニンより下流28塩基の配列を決定した。

(3) CHO細胞由来GMD cDNAの3'末端配列の決定

CHO細胞由来GMDの3'末端cDNA配列を得るため、以下の方法でRACE法を行なった。実施例15の1項(1)で取得したCHO細胞由来RNAより、3'RACE用一本鎖cDNAの作製をSMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素にはPowerScriptTM Reverse Transcriptase (CLONTECH社製)を用いた。調製後の一本鎖cDNAは、キット添付のTricin-EDTA bufferで10倍に希釈したものをPCRの鋳型として用いた。

続いて、上記3'RACE用一本鎖cDNA 1 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号63で示す24merの合成DNAプライマー [本項(1)で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、1倍濃度のUniversal Primer Mix (SMARTTM RACE cDNA Amplification Kitに付属; CLONTECH社製)]を調製し、DNAサーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製)を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該PCR反応液より1 μ lを取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH社製)で20倍希釈した水溶液1 μ lを鋳型として含む20 μ lの反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5単位のEX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ Mの配列番号64で示す25merの合成DNAプライマー [本項(1)で決定したCHO細胞由来GMD cDNA配列より作製]、0.5 μ MのNested Universal Primer (SMARTTM

RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した後、94°Cにて1分間、68°Cにて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 700bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 3' GMD を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の終止コドンより上流 27 塩基の配列、及び 3' 側の non-coding 領域 415bp の塩基配列を決定した。

以上、本項 (1)、(2)、(3) より決定した CHO 由来 GMD 遺伝子の全長 cDNA 配列を配列番号 65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 71 に示す。

2. CHO/DG44 細胞の GMD 遺伝子を含むゲノム配列の決定

実施例 17 の 1 項で決定したマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 66 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、以下の方法で CHO 細胞由来ゲノム DNA を取得した。CHO/DG44 細胞由来 KC861 株を IMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地 [HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地] に 3×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) に 2ml/ウェルずつ分注した。37°Cの 5%CO₂ インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従ってゲノム DNA を調製し、TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/l Tris-HCl、1mmol/l EDTA、200 μ g/ml RNase A) 150 μ l に一晩溶解した。

上記で取得した CHO/DG44 細胞由来ゲノム DNA を 100ng、20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 59 と配列番号 66 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°Cにて 5 分間加熱した

後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 100bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex3 を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 67 に示した。

次に、実施例 17 の 1 項で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 68 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、及び配列番号 69 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44 由来ゲノム DNA を 100ng、20 μ l の反応液 [1 \times EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mM dNTP's、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5 μ M の配列番号 68 と配列番号 69 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 200bp の DNA 断片を Gene Clean II kit (BI0101 社製) を用い、添付マニュアルに従って回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex4 を得た。DNA シークエンサー377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 70 に示した。

実施例 18. 市販抗体の糖鎖解析

CHO 細胞を宿主細胞にして産生させた市販抗 HER2/neu 抗体ハーセプチン (Herceptin; GENENTECH 社、Roche 社製) の糖鎖解析を、実施例 10 の (6) の方法にしたがって行った (第 31 図)。ピーク面積から計算すると、Herceptin の α -1,6-フコースのない糖鎖含量は 16%、 α -1,6-フコース結合糖鎖含量は 84%であった。他

の市販抗体に関しても同様の分析を行った結果、Rituxan (GENENTECH 社、Roche 社、IDEC 社製)、Zenapax (Roche 社、PDL 社製) では Herceptin よりも α -1,6-フコースのない糖鎖含量が少なかった。

第 31 図は、Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相 HPLC の分析条件、糖鎖構造、 α -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は実施例 11 の(6)と同じ方法で行った。

産業上の利用可能性

本発明によれば、抗体組成物を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた抗体組成物の製造方法、抗体組成物、ならびにその用途を提供することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 4-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 8-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 15-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 26-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 27-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 28-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 29-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 30-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 31-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 35-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 47-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 52-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 53-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 54-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 55-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 56-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 57-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 58-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 59-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 60-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 61-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 62-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 63-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 64-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 66-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 68-人工配列の説明：合成 DNA
配列番号 69-人工配列の説明：合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞。

2. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、請求の範囲 1 に記載の CHO 細胞。

3. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 1 または 2 項に記載の CHO 細胞。

4. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

5. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 4 に記載の CHO 細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

6. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

7. GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

8. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

9. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

10. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

11. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

12. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 4 に記載の CHO 細胞。

13. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

14. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

15. 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、請求の範囲 4~14 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法 ;

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法 ;

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法 ;

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法 ;

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

16. 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 4~15 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

17. 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 4~16 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

18. 抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 17 記載の CHO 細胞。

19. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、請求の範囲 18 記載の CHO 細胞。

20. 請求の範囲 1~19 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

21. 請求の範囲 20 に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

22. CHO 細胞が産生する N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物。

23. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

24. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 23 記載の細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

25. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

26. GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。
- (c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

27. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

28. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
- (b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;
- (c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

29. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

30. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

31. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 23 に記載の細胞。

32. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA；

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA；

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

33. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

- (c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (d) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

34. 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、請求の範囲 23～33 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

35. 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 23～34 のいずれか 1 項に記載の細胞。

36. 請求の範囲 23～35 のいずれか 1 項に記載の細胞が、下記の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

37. 請求の範囲 23～36 のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

38. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 37 記載の細胞。

39. 請求の範囲 37 または 38 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

40. 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 39 に記載の方法。

41. 請求の範囲 39 または 40 に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

42. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

43. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、請求の範囲 42 記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

44. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

45. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

46. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

47. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

48. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

49. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 48 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

50. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、請求の範囲 42~49 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

51. 請求の範囲 42～50 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

52. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 51 に記載の方法。

53. ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 51 または 52 に記載の方法。

54. 請求の範囲 51～53 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

55. 請求の範囲 21、22、41 または 54 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

56. 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、請求の範囲 55 に記載の医薬。

57. 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i) 及び (j) からなる群から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

- (f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；
- (g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
- (i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

58. 請求の範囲 57 記載の蛋白質をコードする DNA。

59. 以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

- (a) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA；
- (b) 配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA；
- (c) 配列番号 65 で表される塩基配列を含む DNA；
- (d) 配列番号 48 で表される塩基配列を含む DNA；
- (e) 配列番号 51 で表される塩基配列を含む DNA。

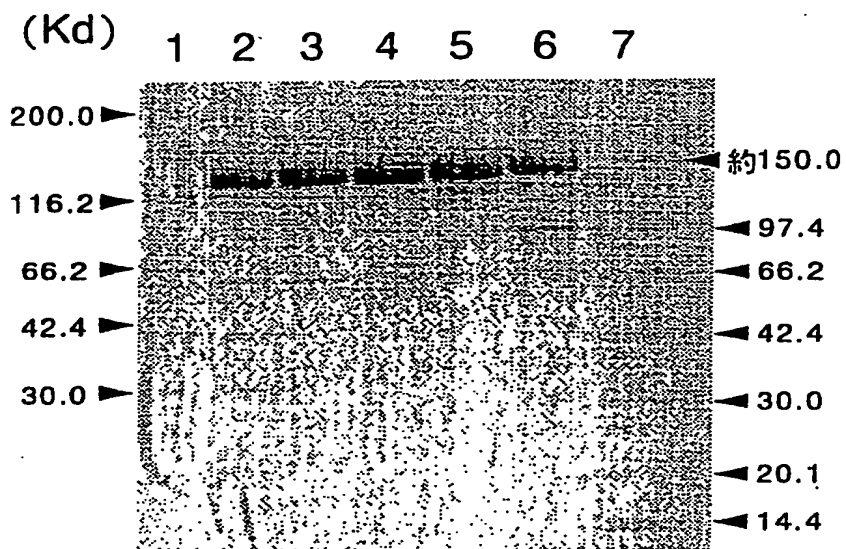
60. 以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれるゲノム DNA。

- (a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；
- (b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA；
- (c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

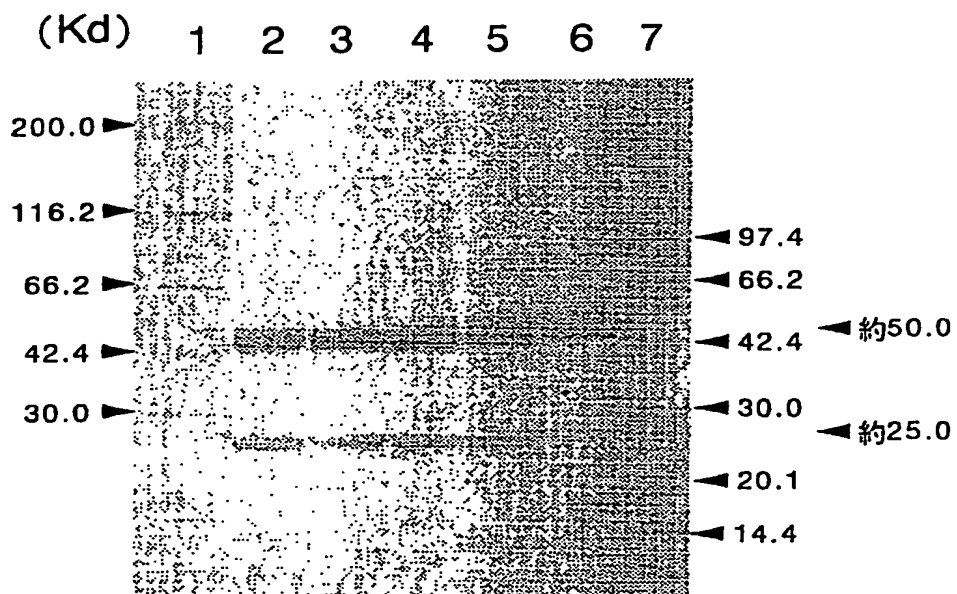
61. 請求の範囲 58～60 のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。

第 1 図

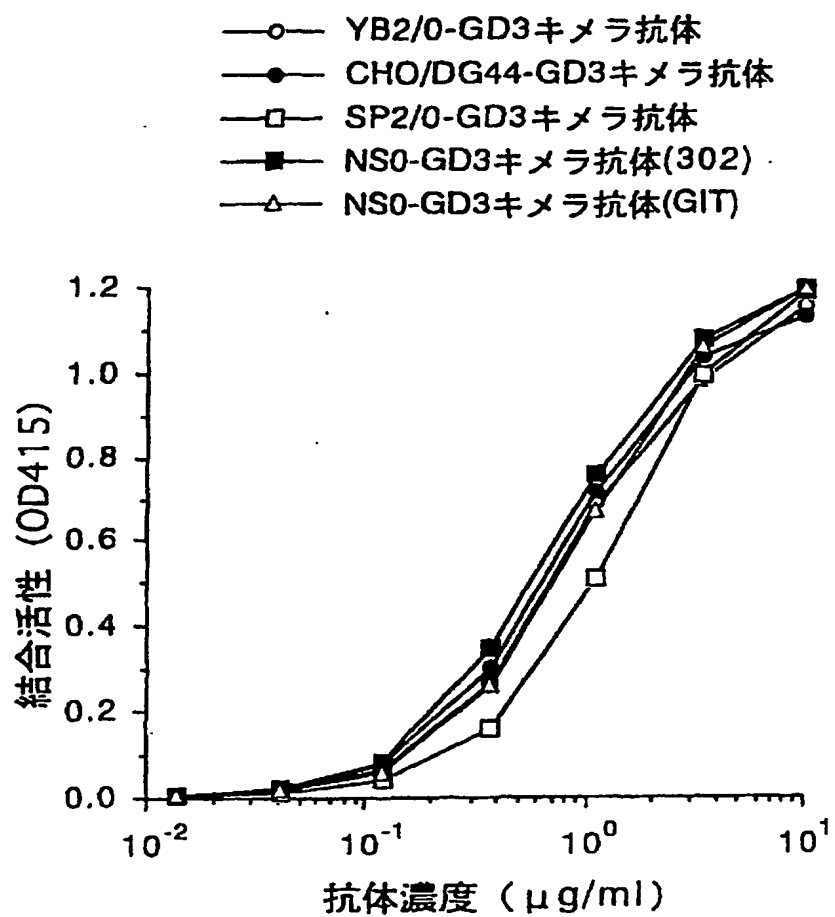
1A



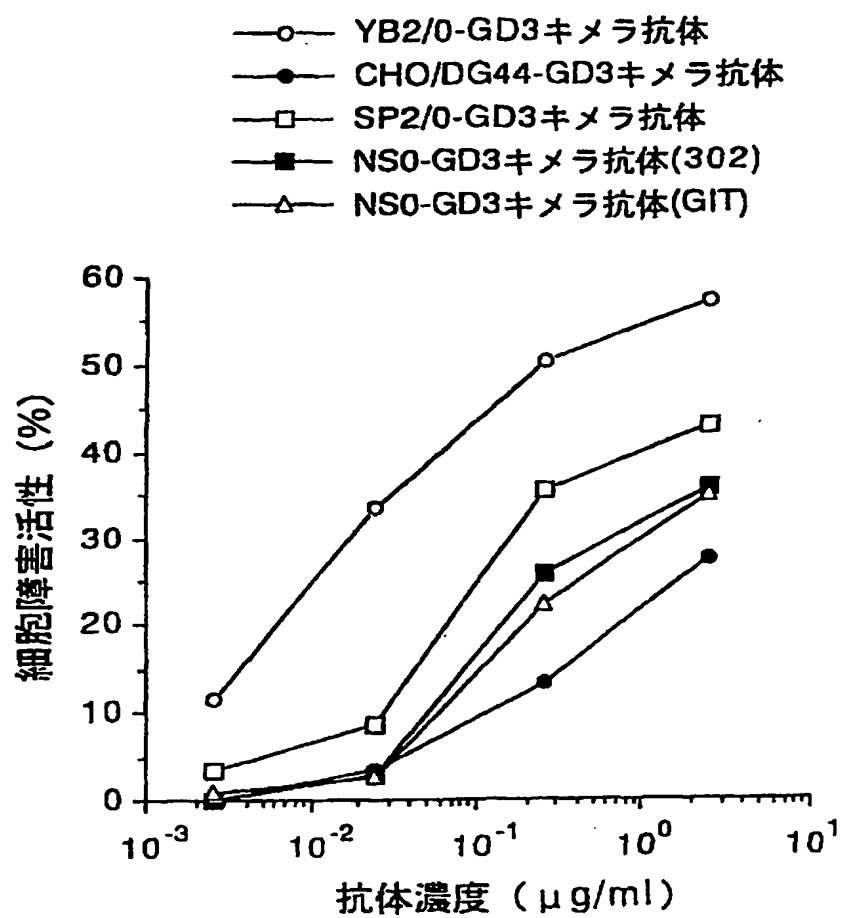
1B



第2図

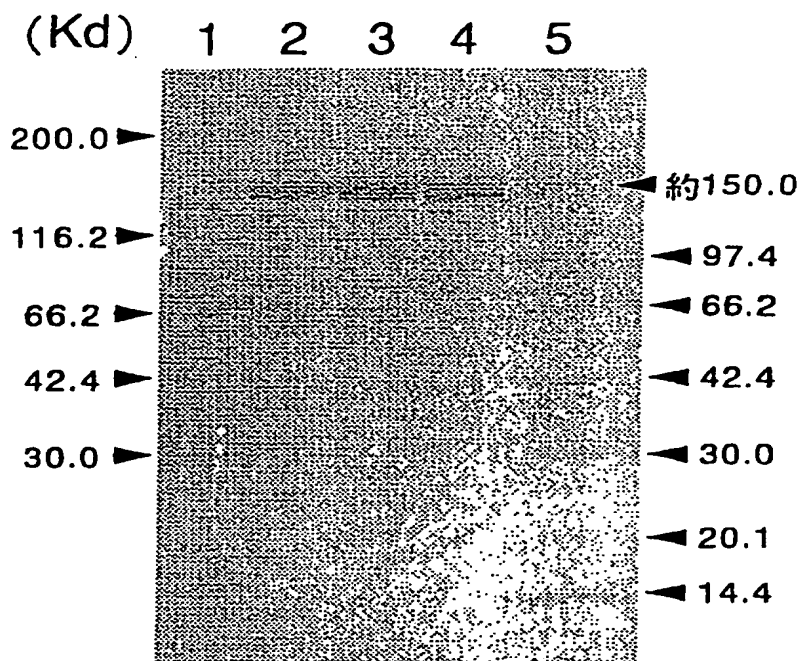


第3図

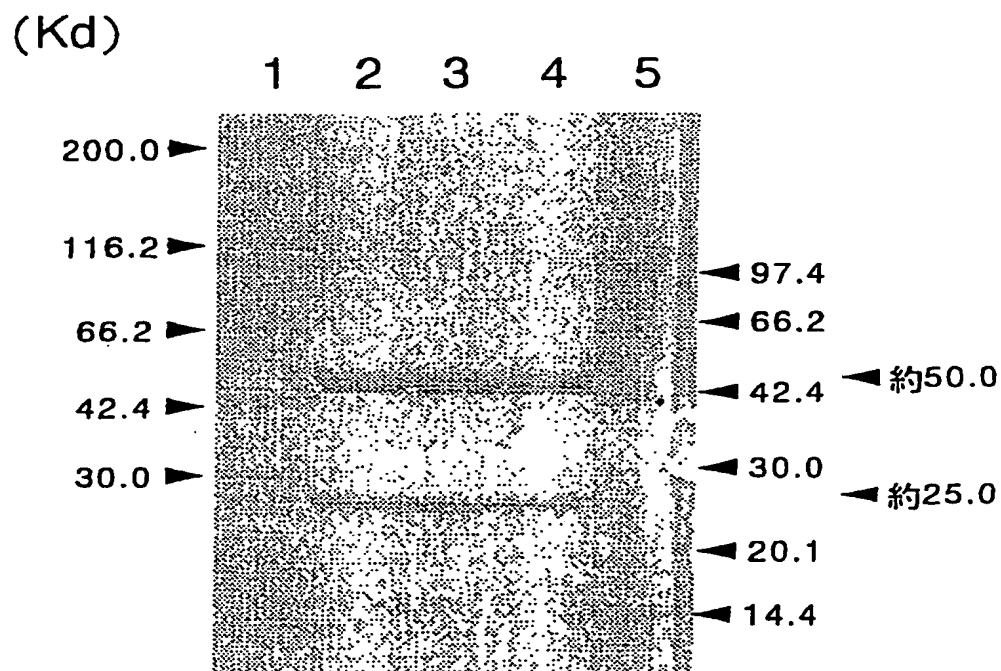


第 4 図

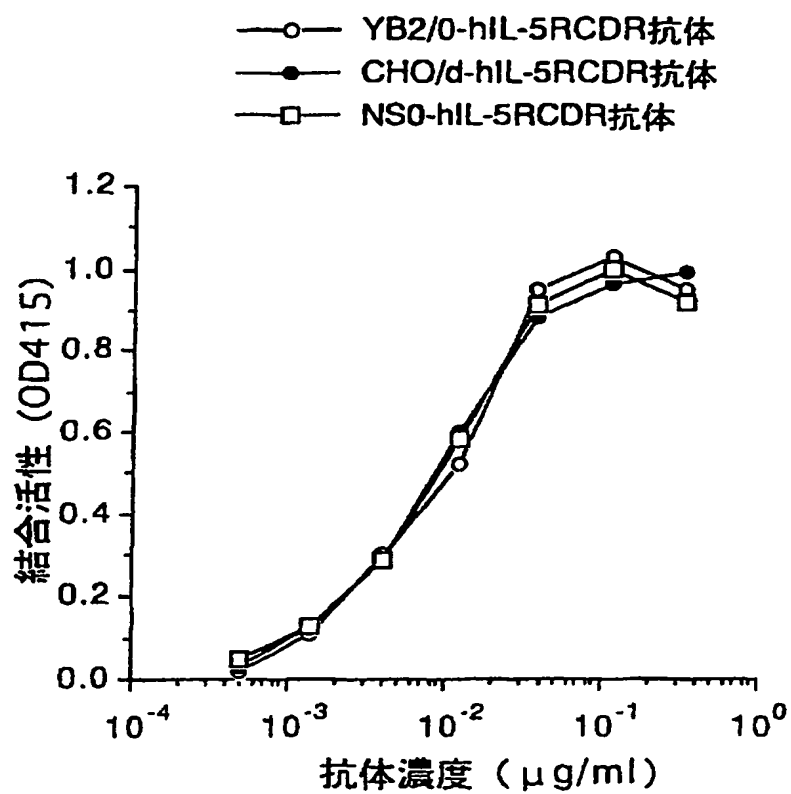
4A



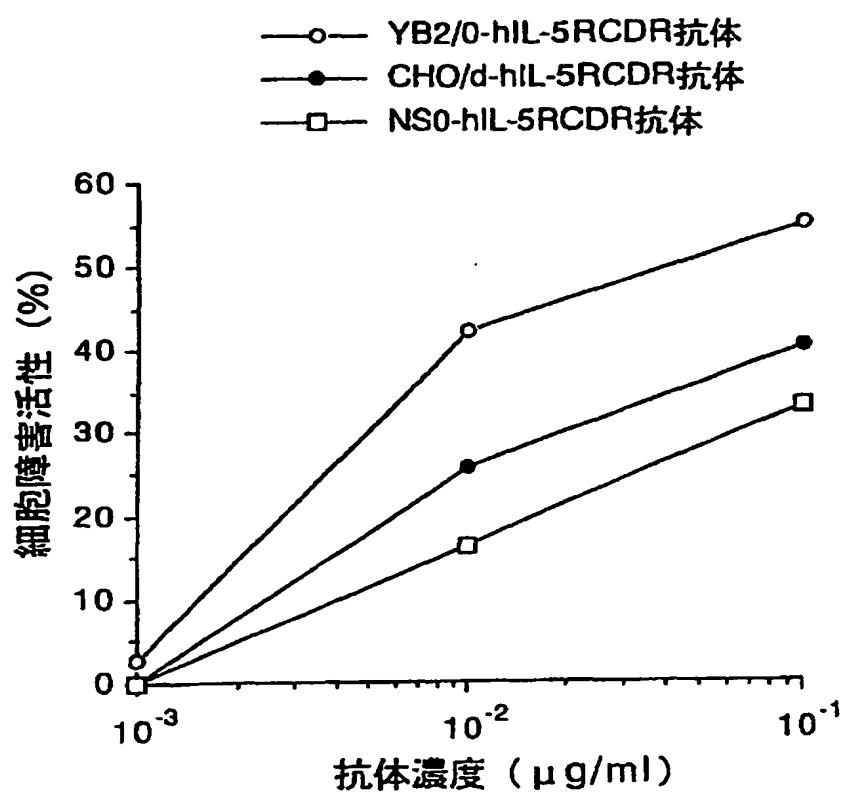
4B



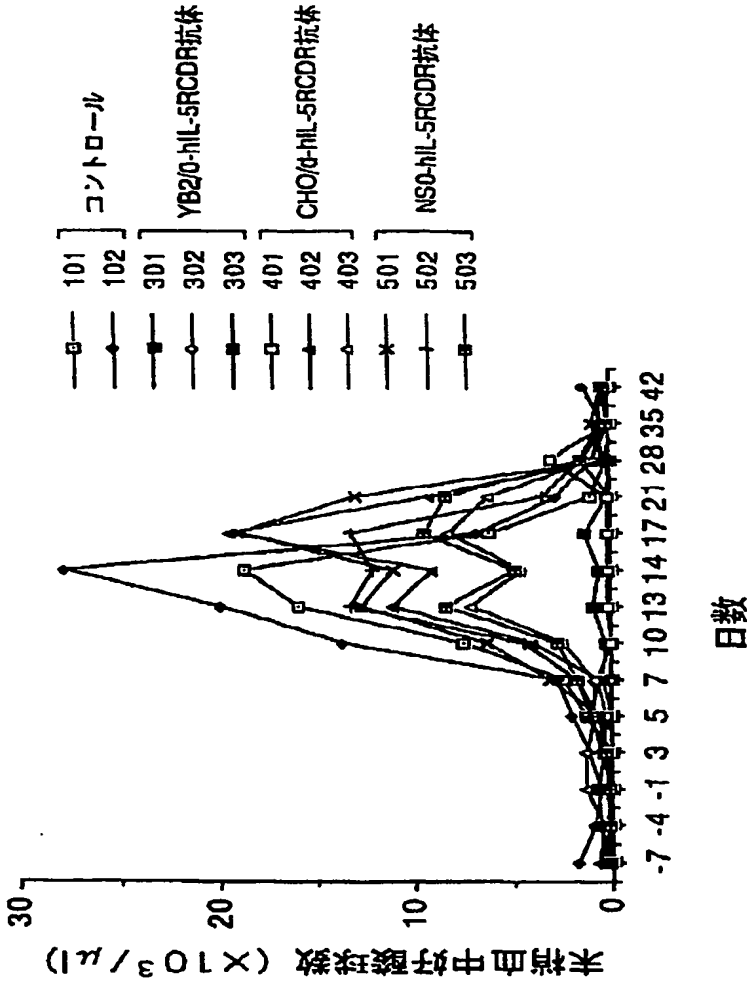
第 5 図



第 6 図

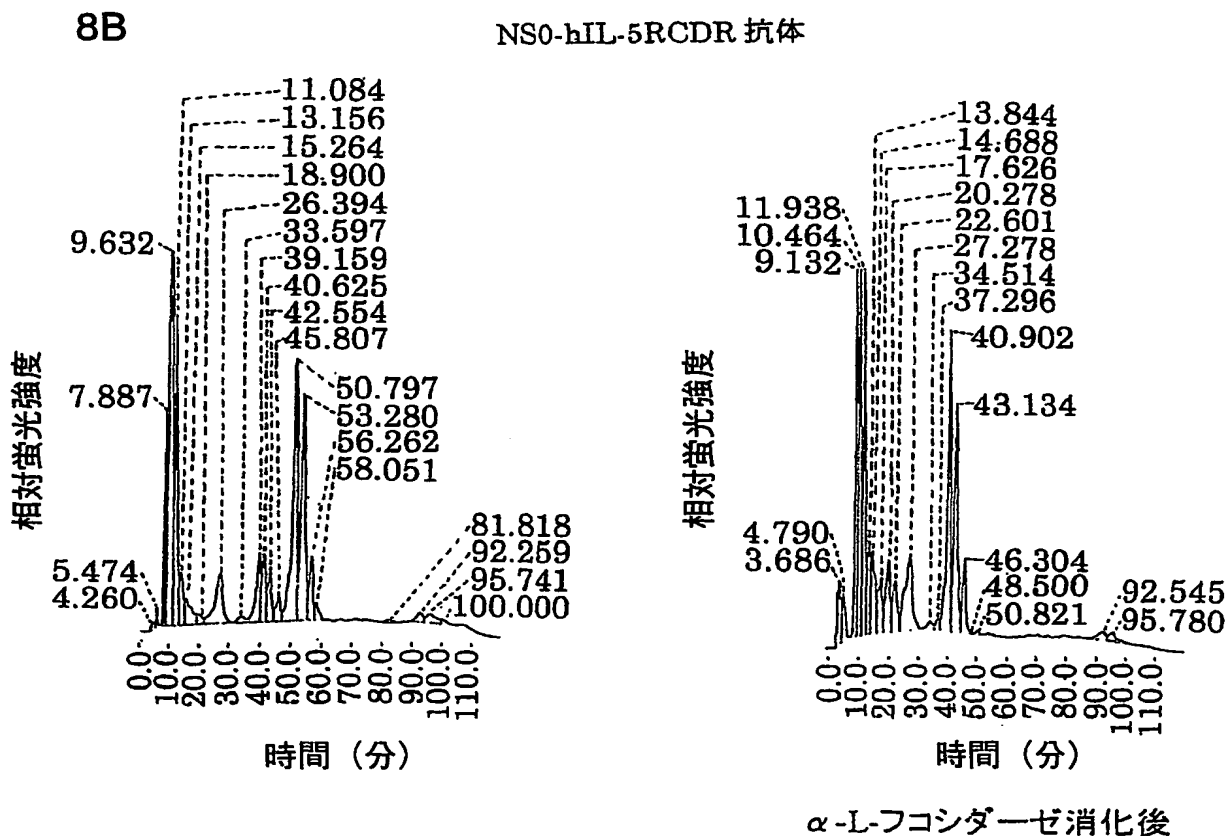
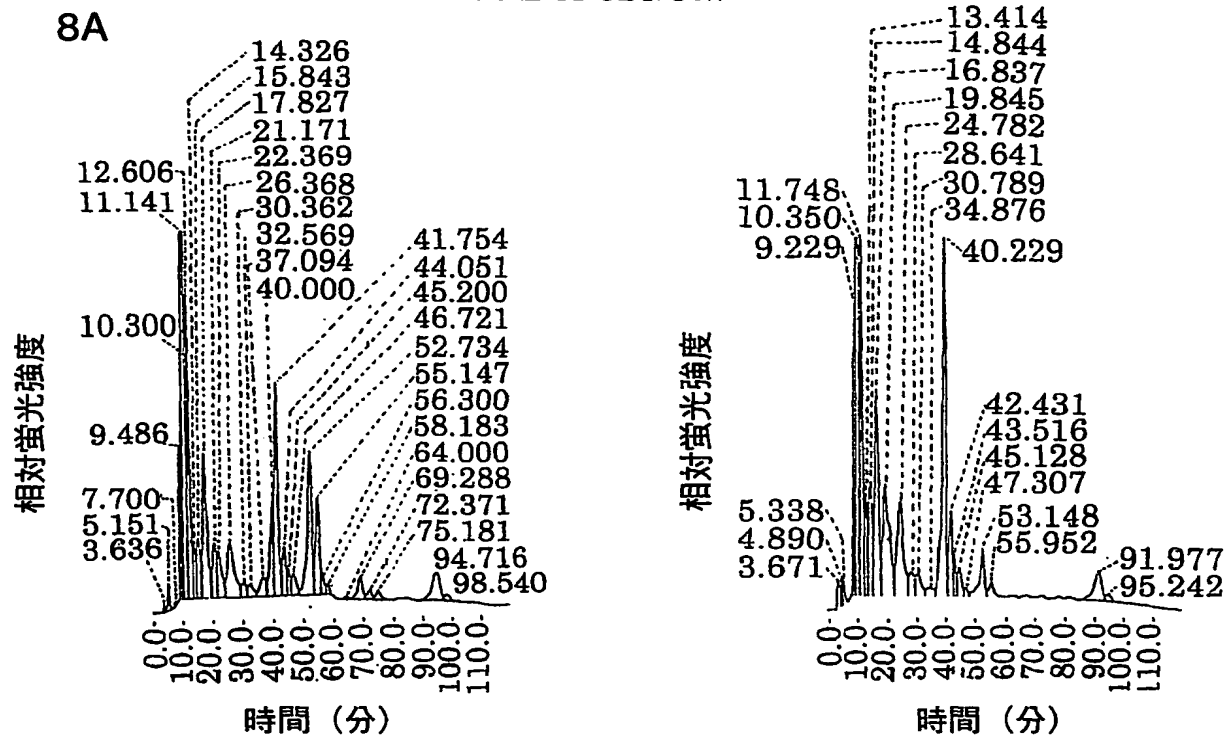


第7図

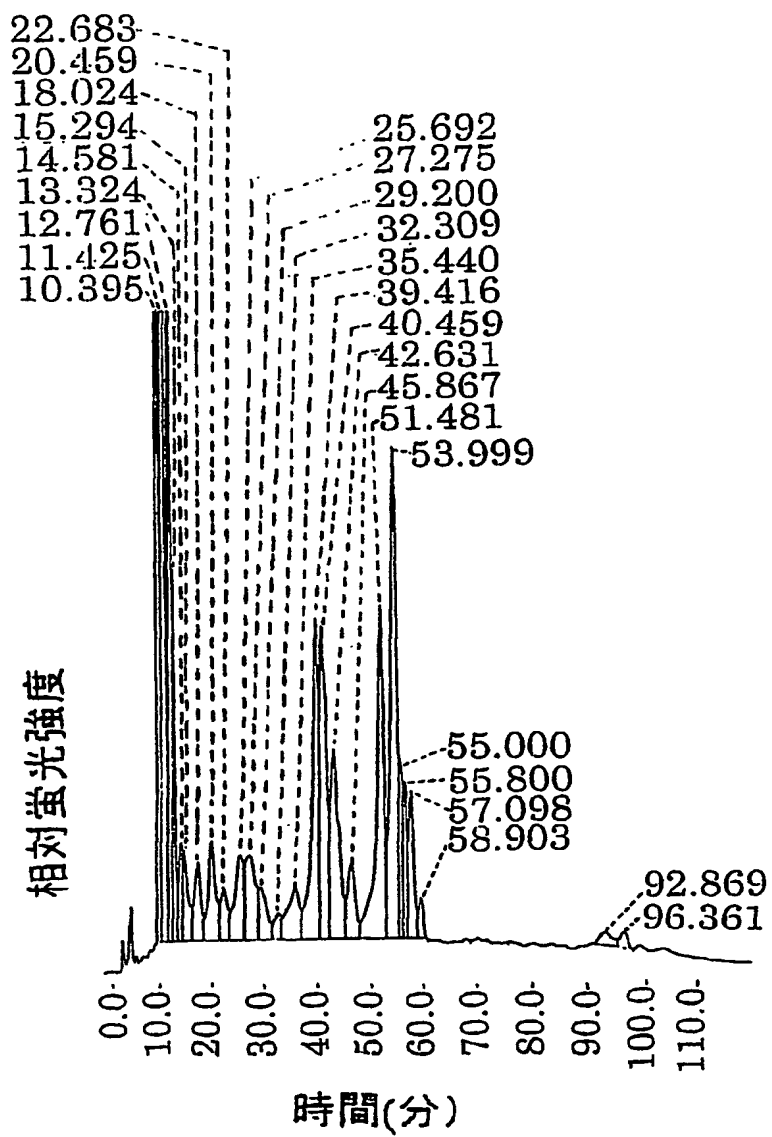


第 8 図

YB2/0-hIL-5RCDR 抗体

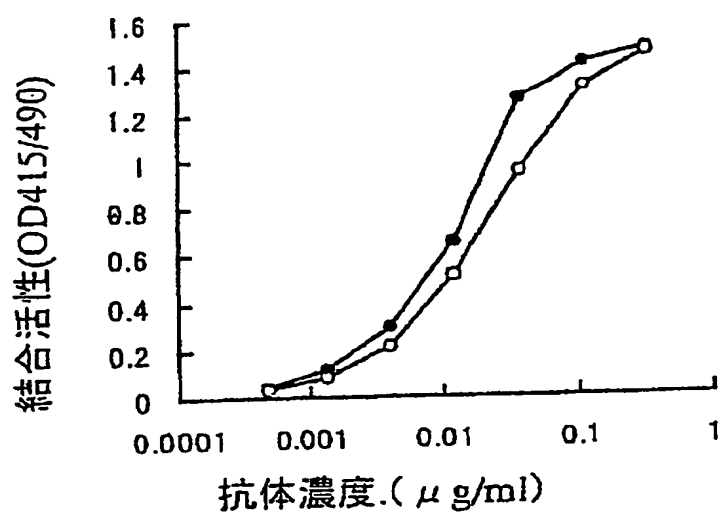


第 9 図

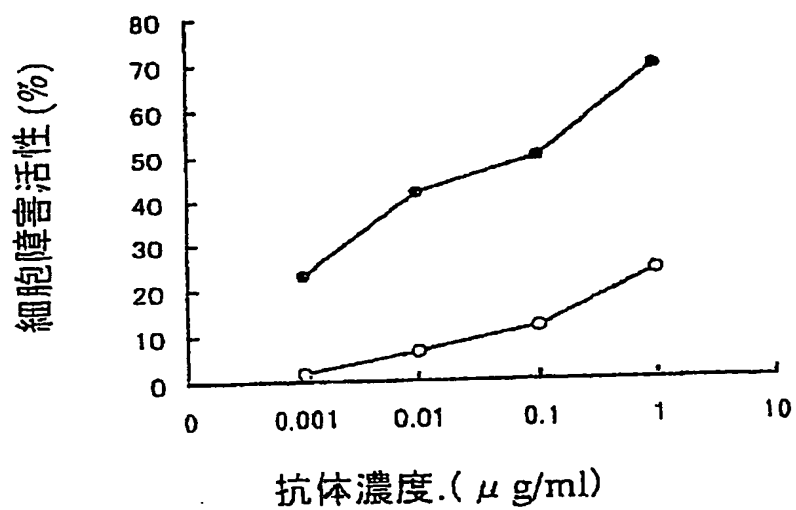


第 10 図

10A



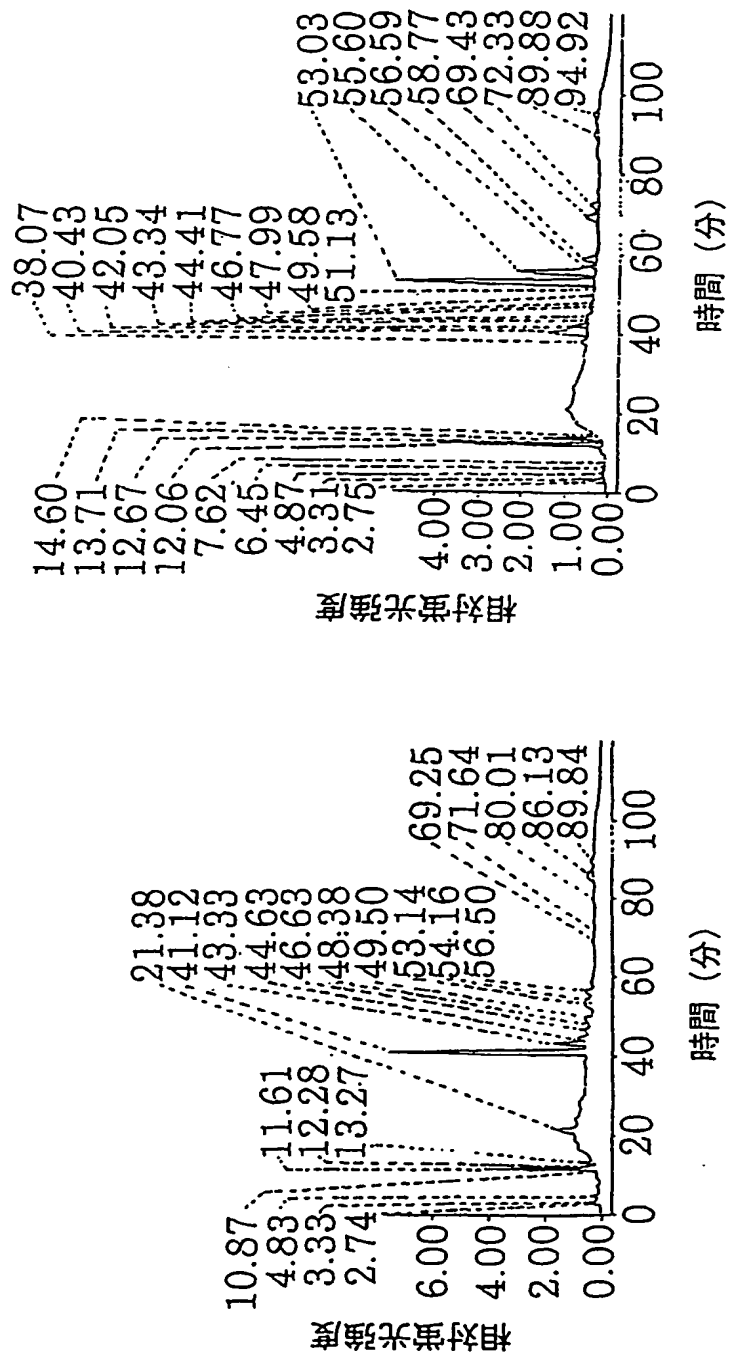
10B



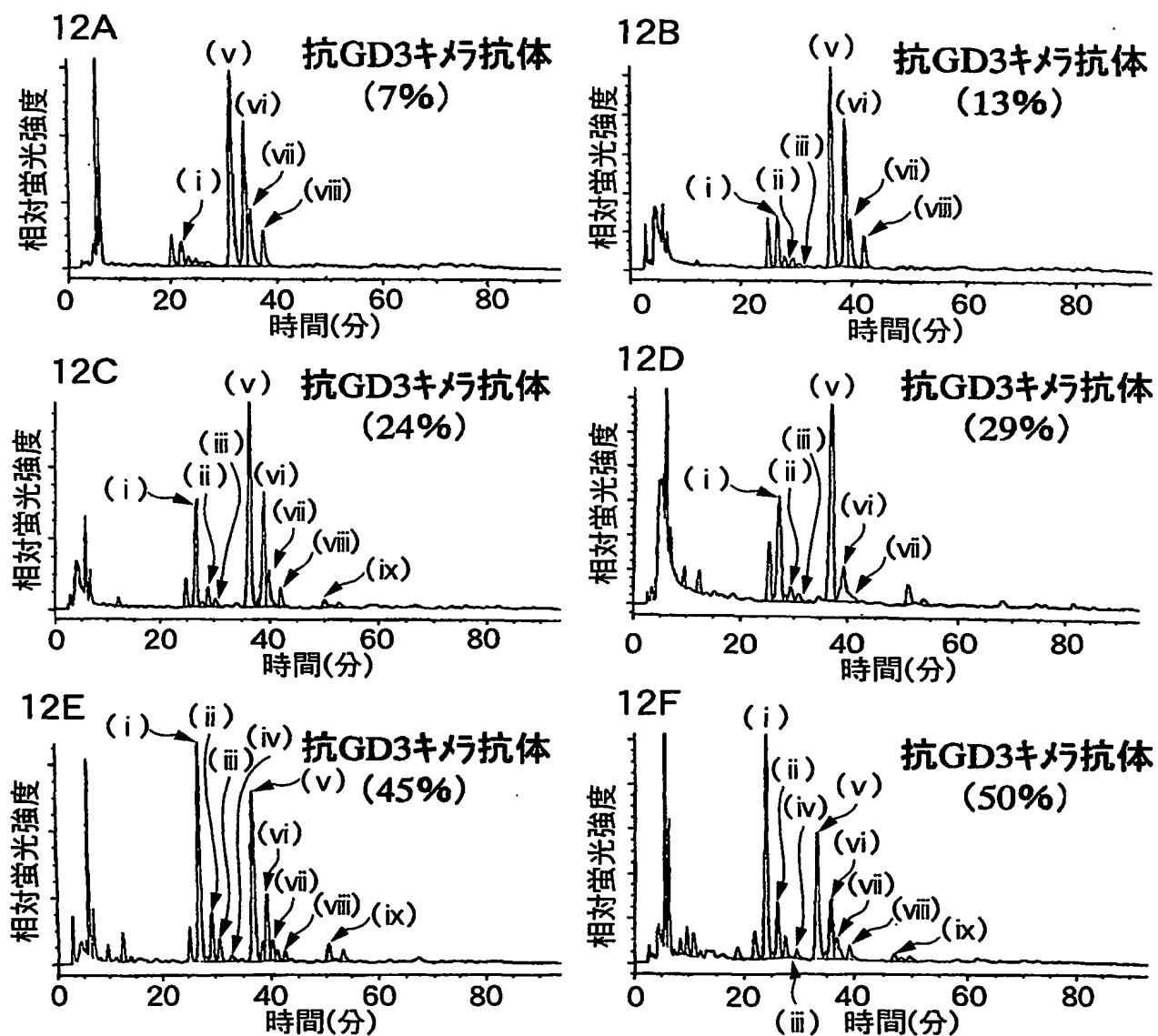
第11図

11A

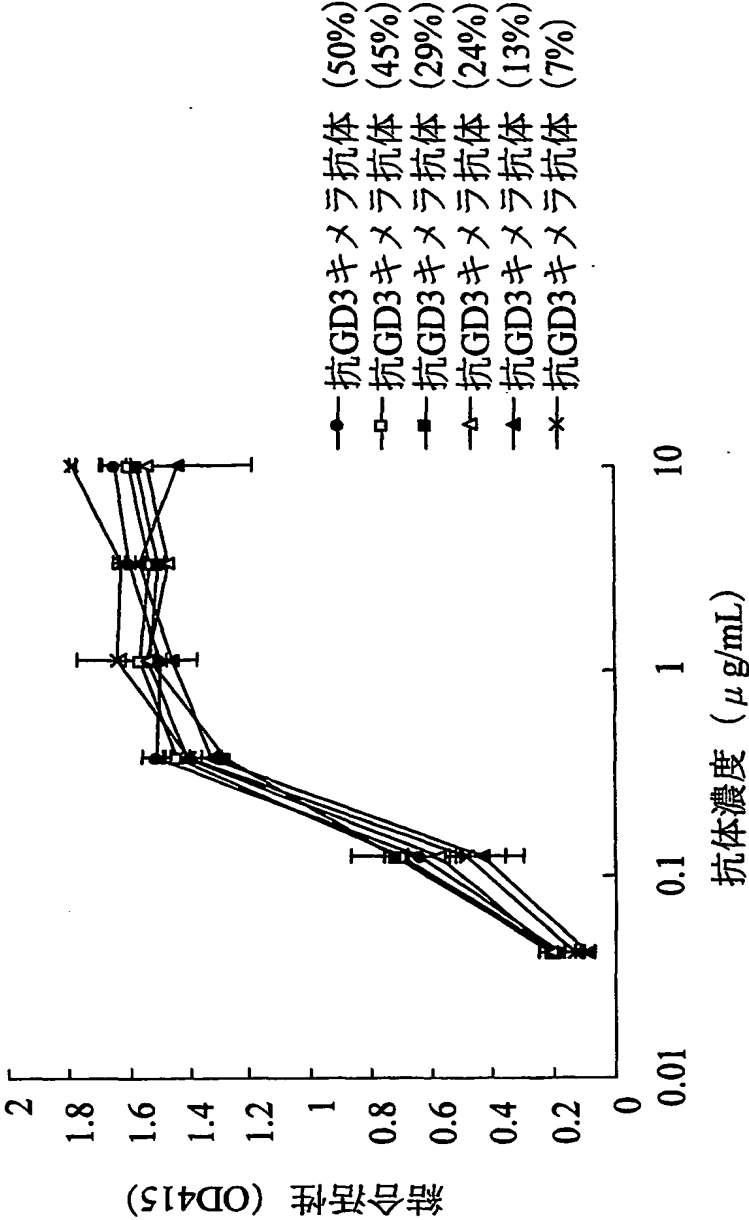
11B



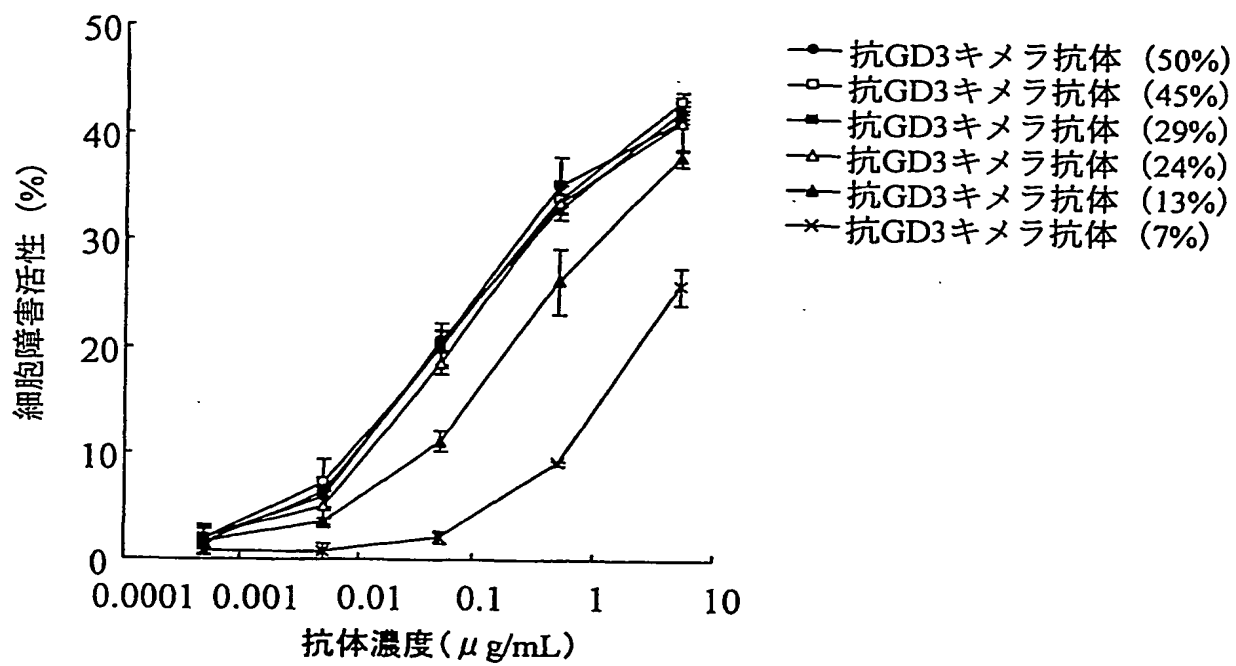
第12図



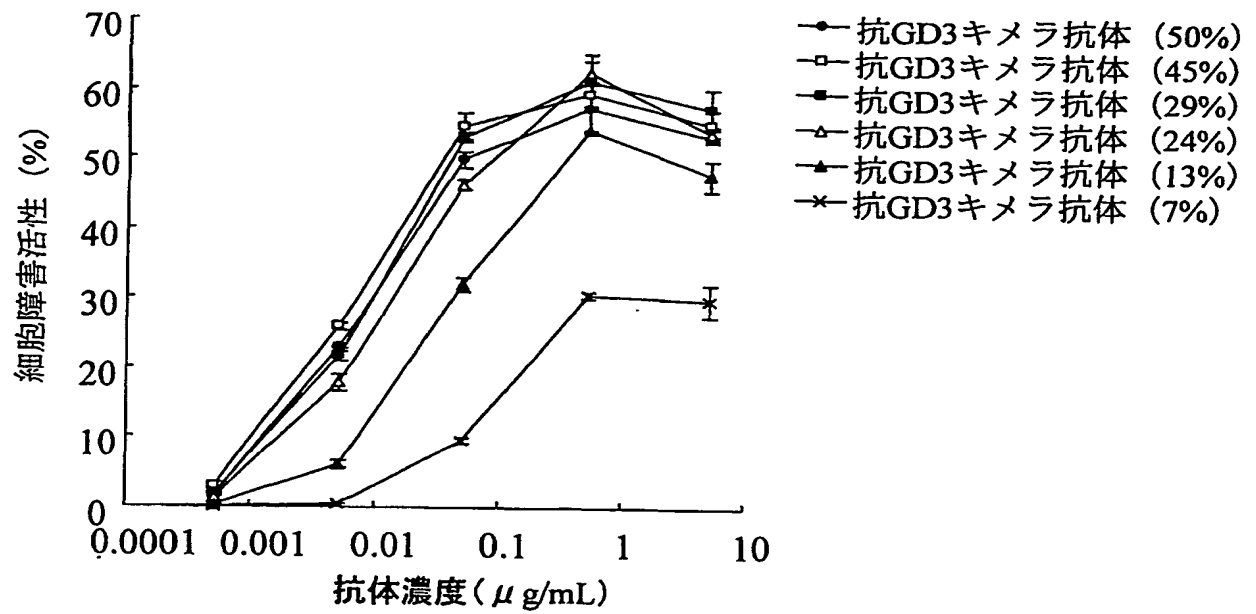
第13図



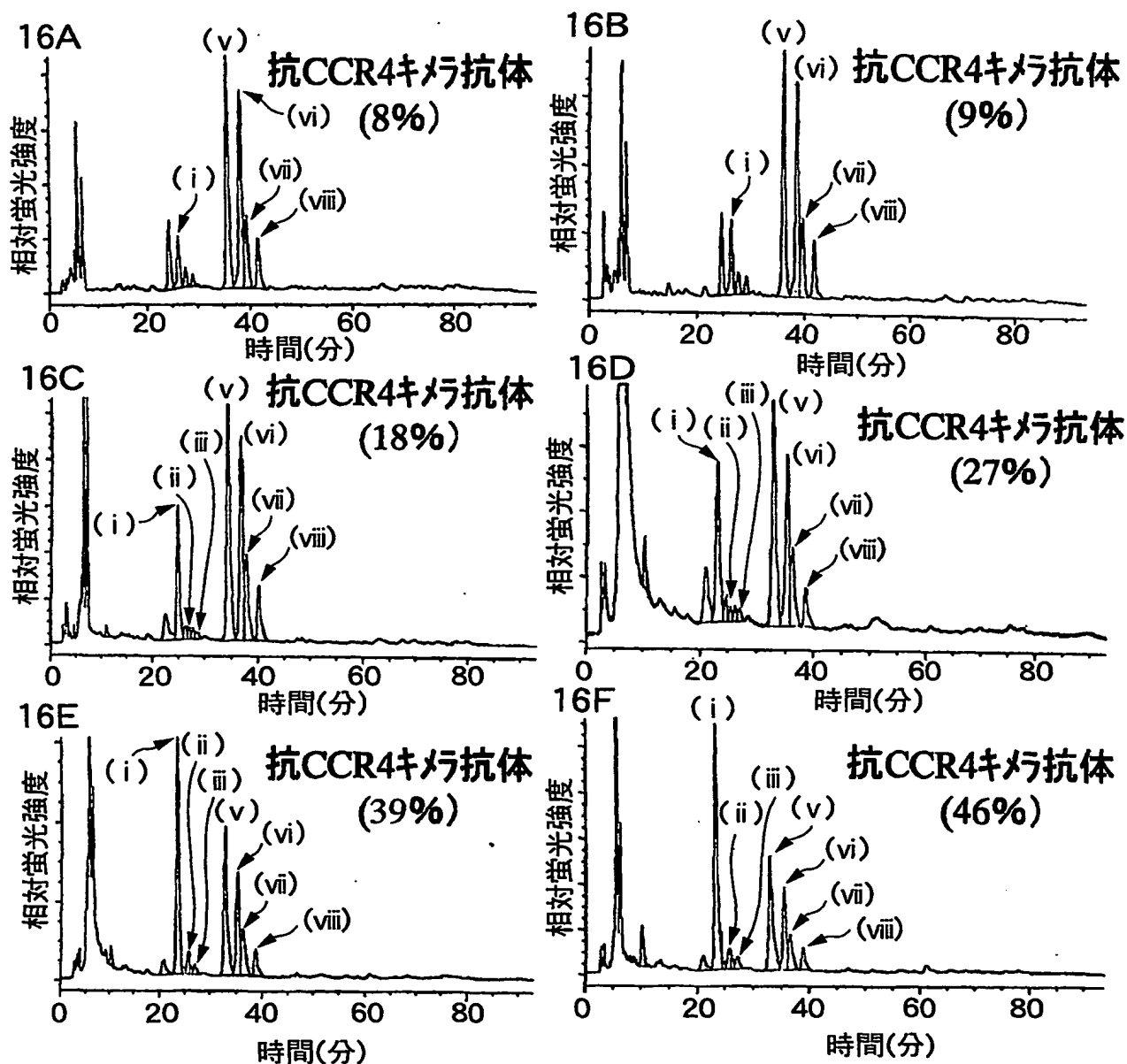
第 14 図



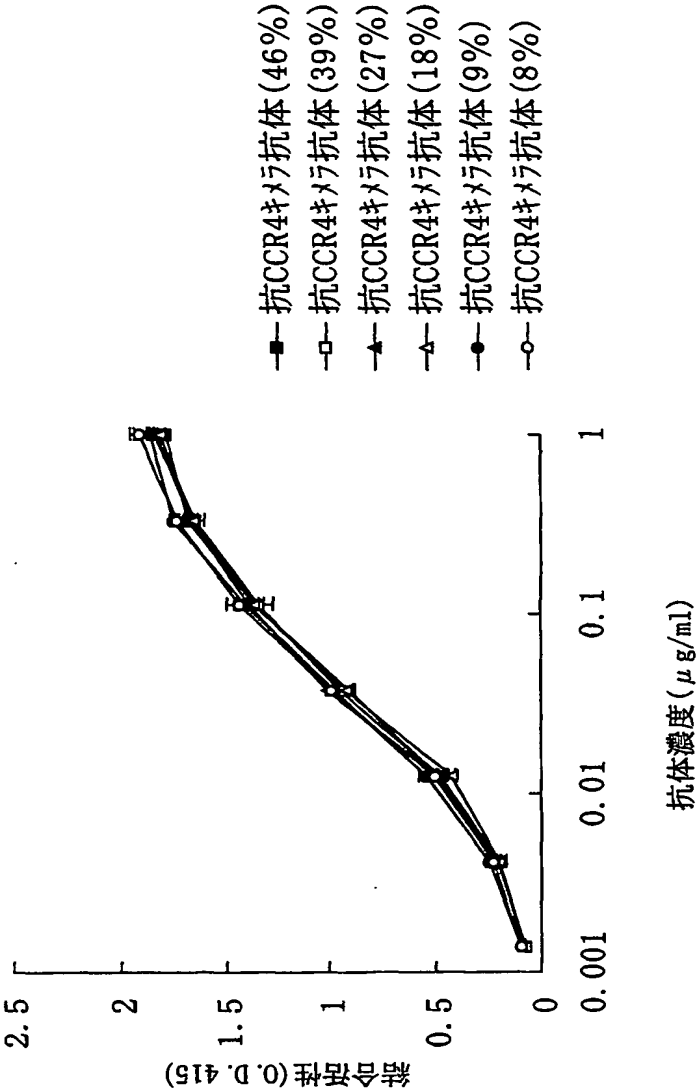
第 15 図



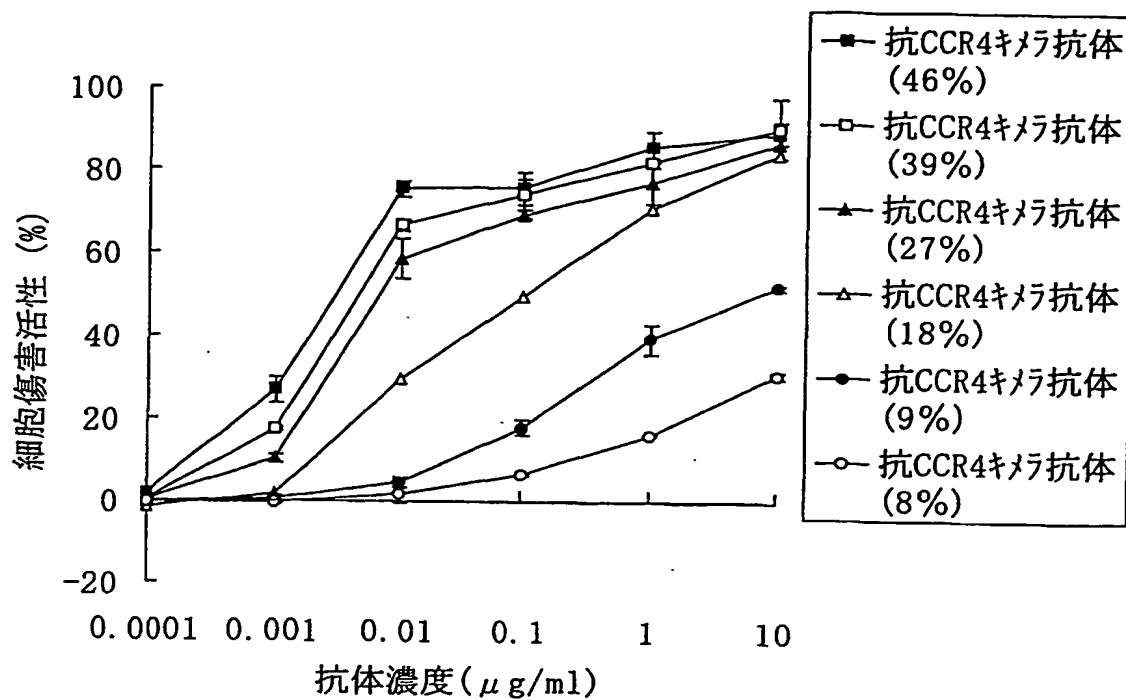
第16図



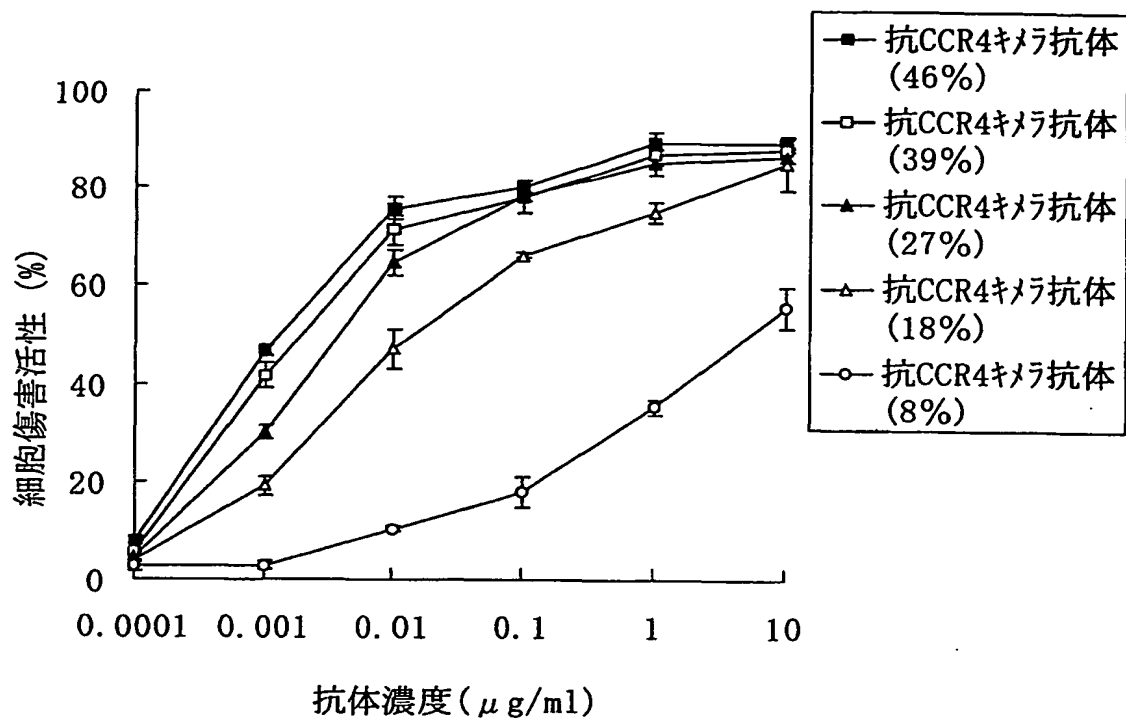
第17図



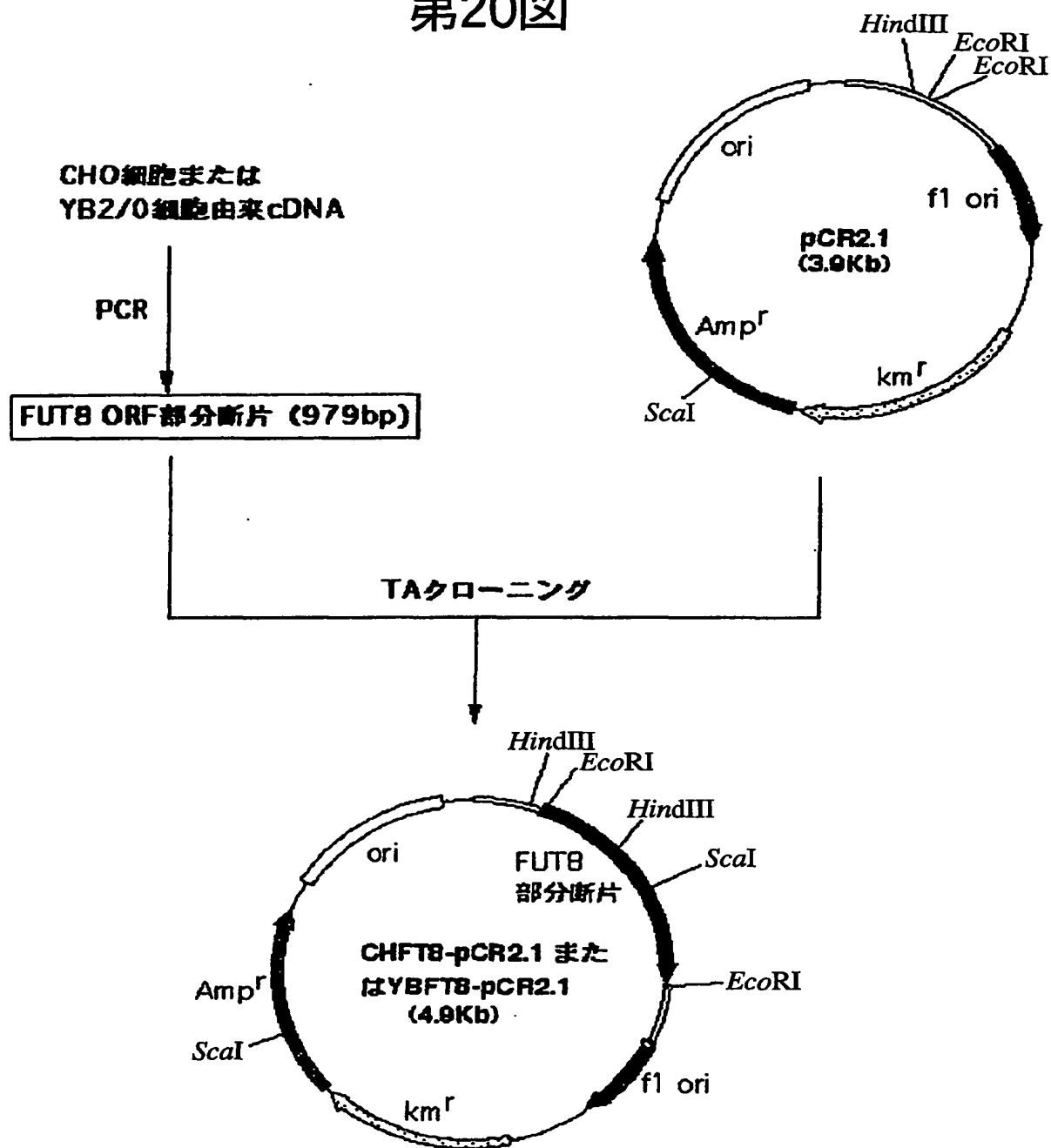
第 18 図



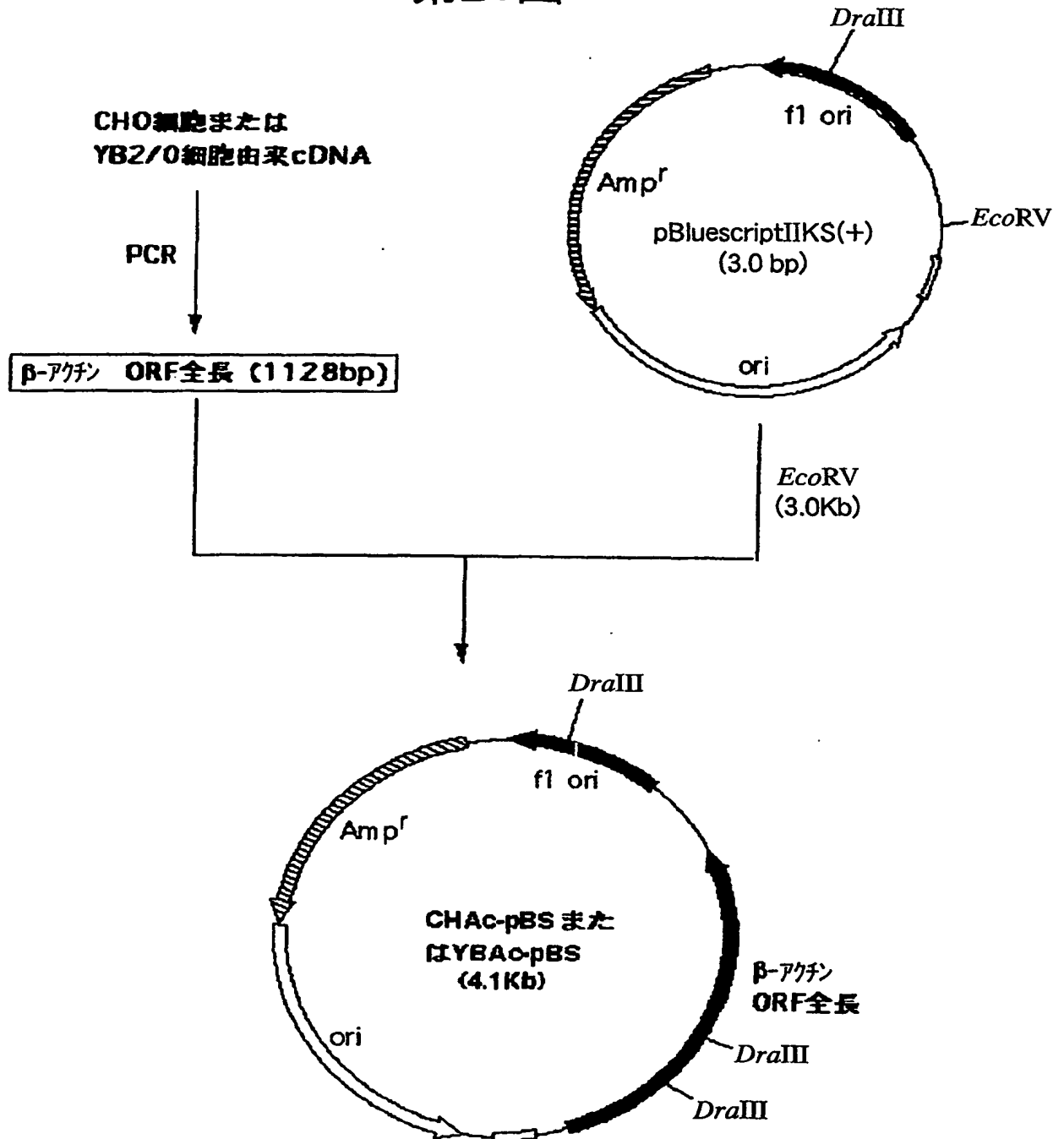
第 19 図



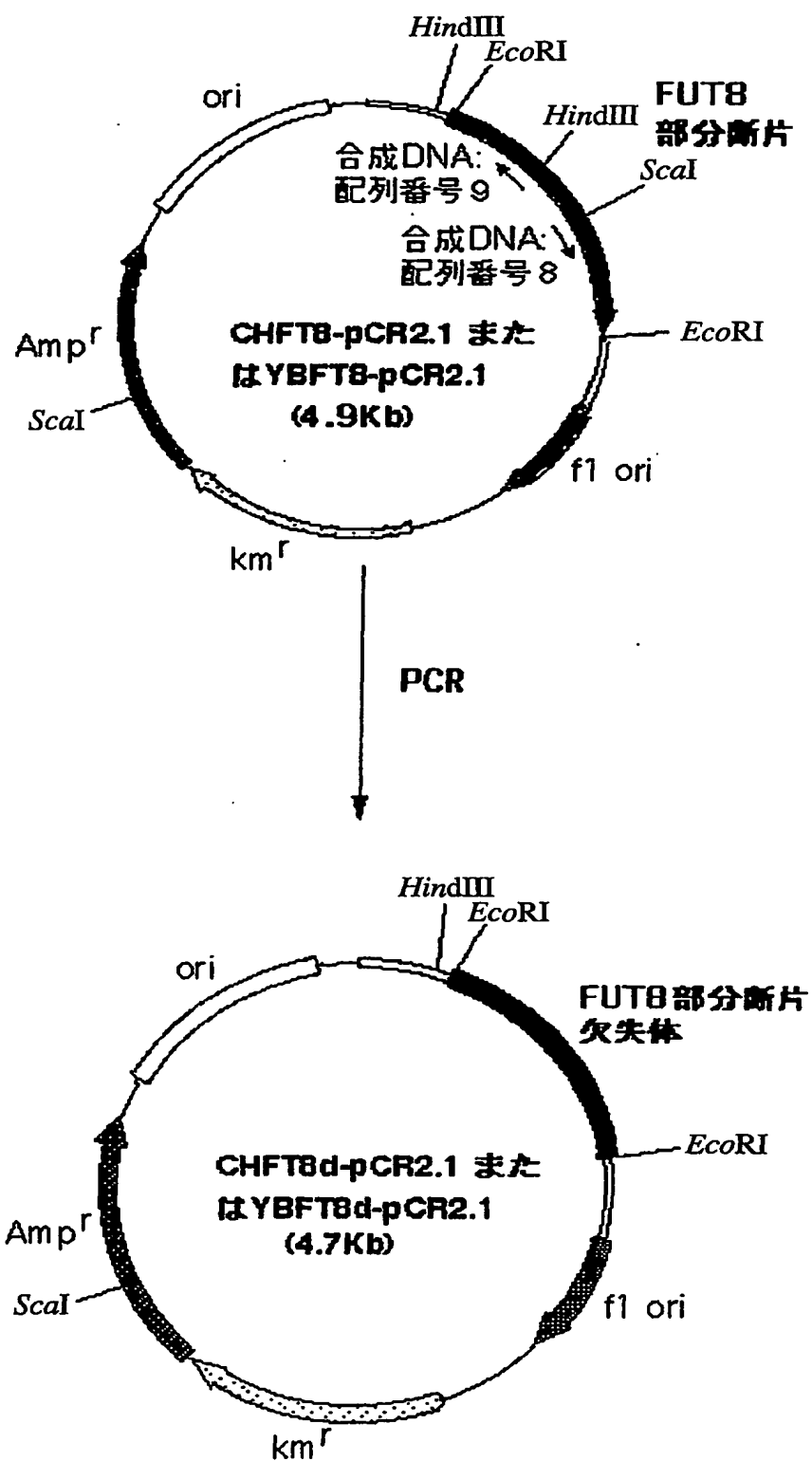
第20図



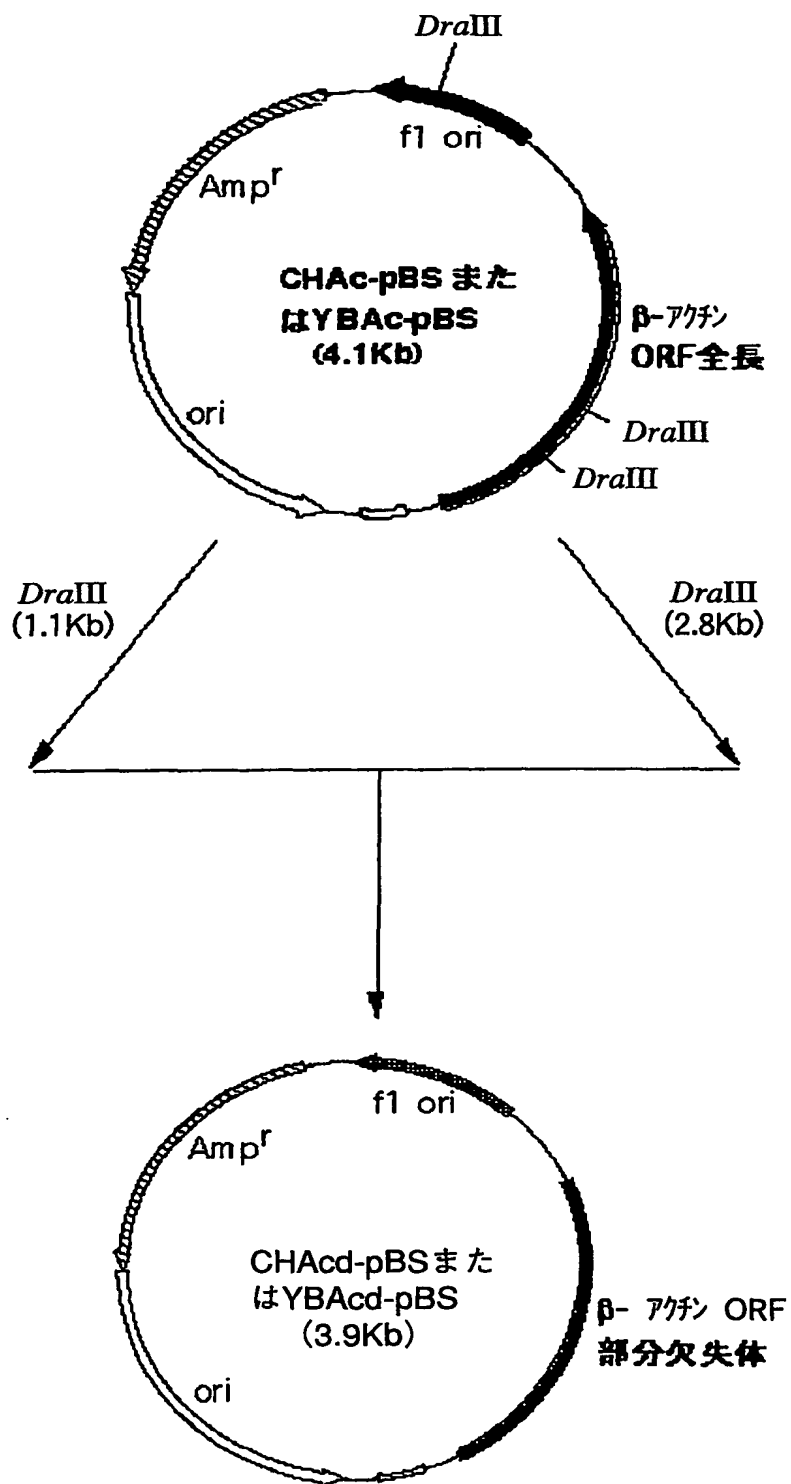
第21図



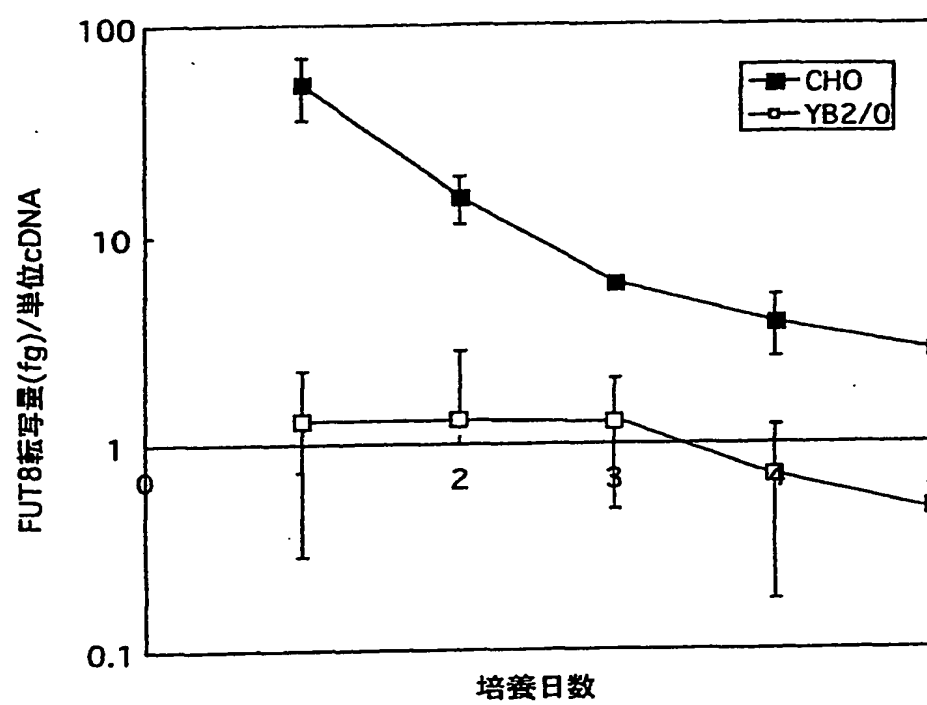
第22図



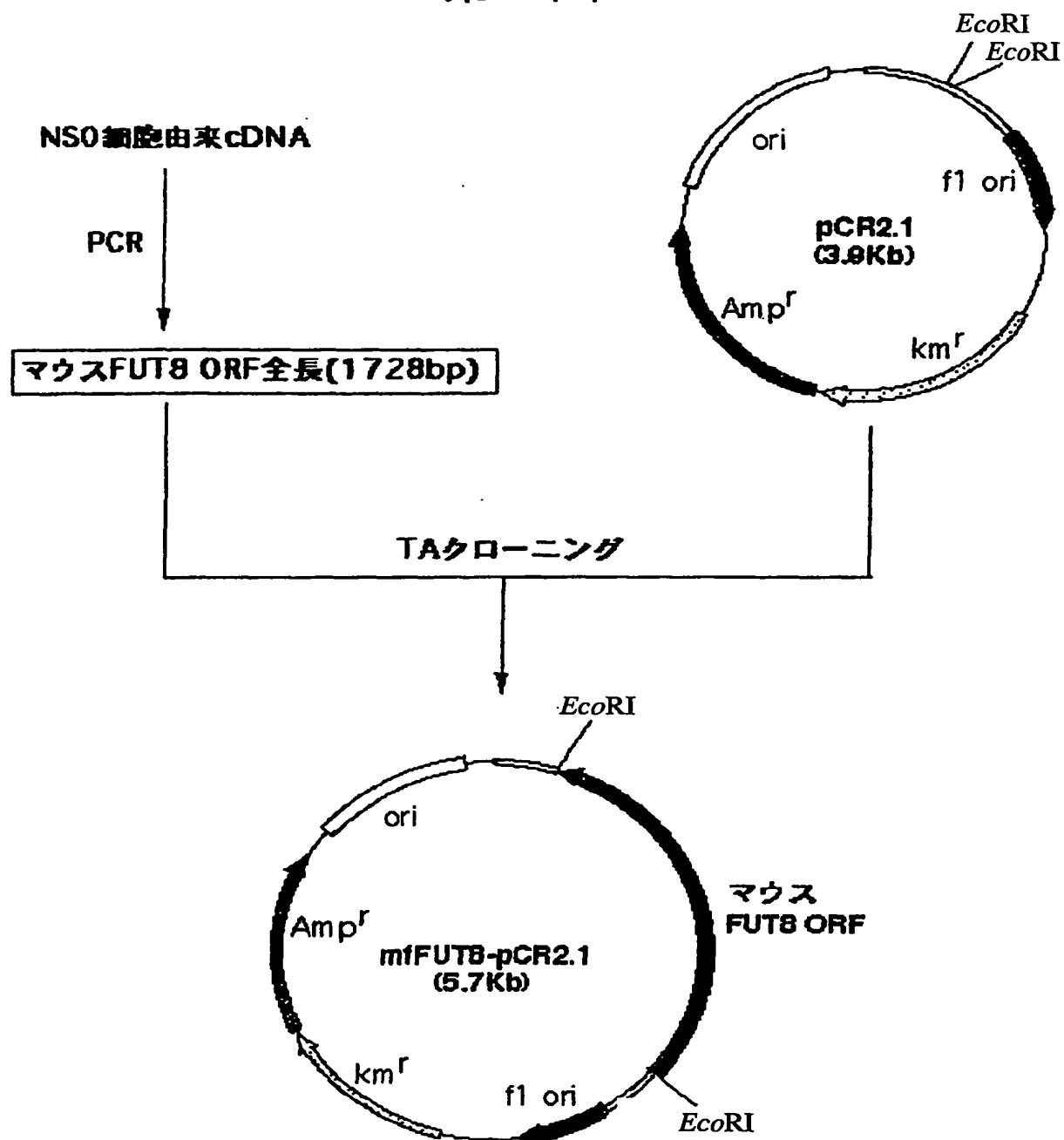
第23図



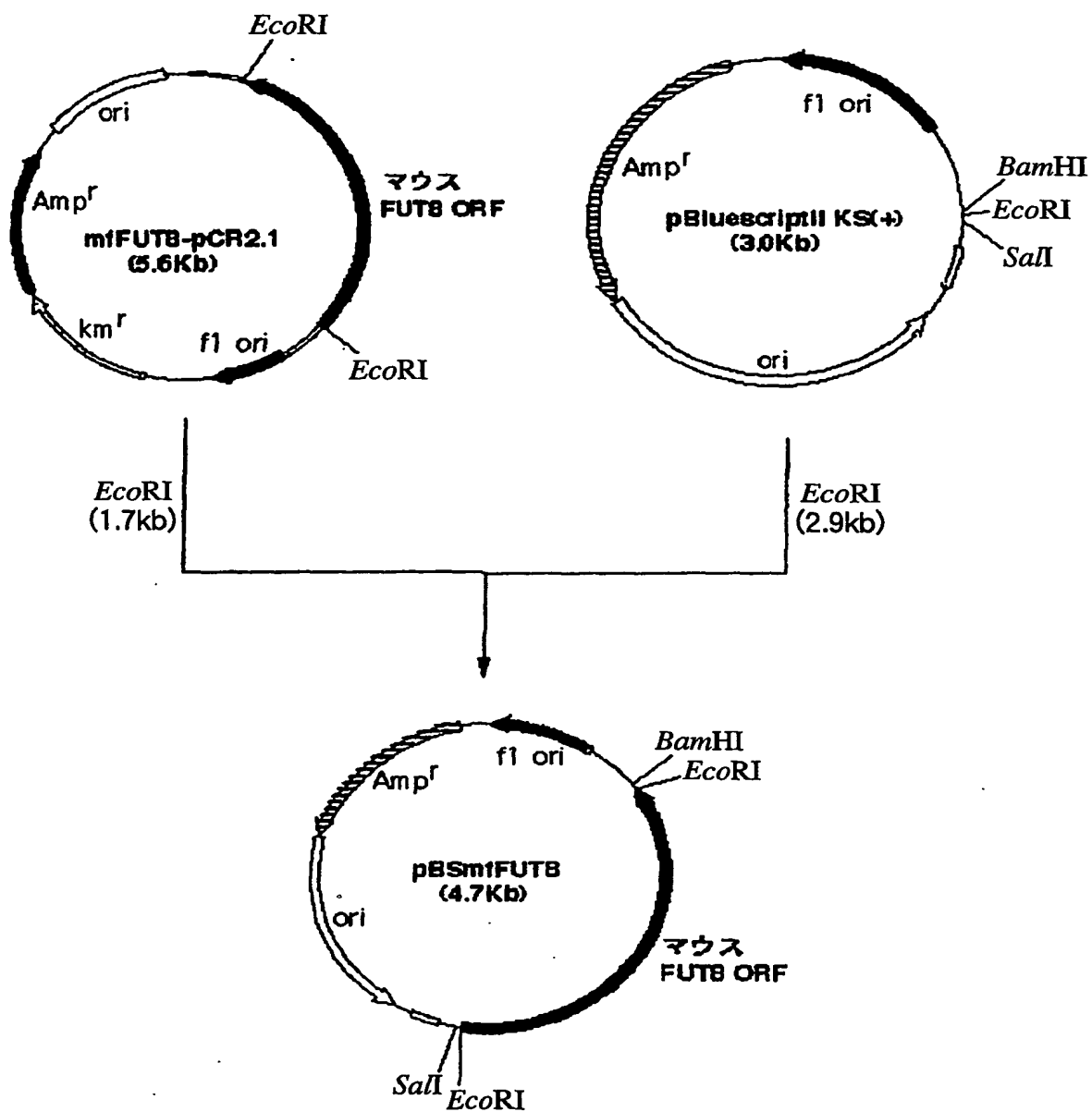
第 24 図



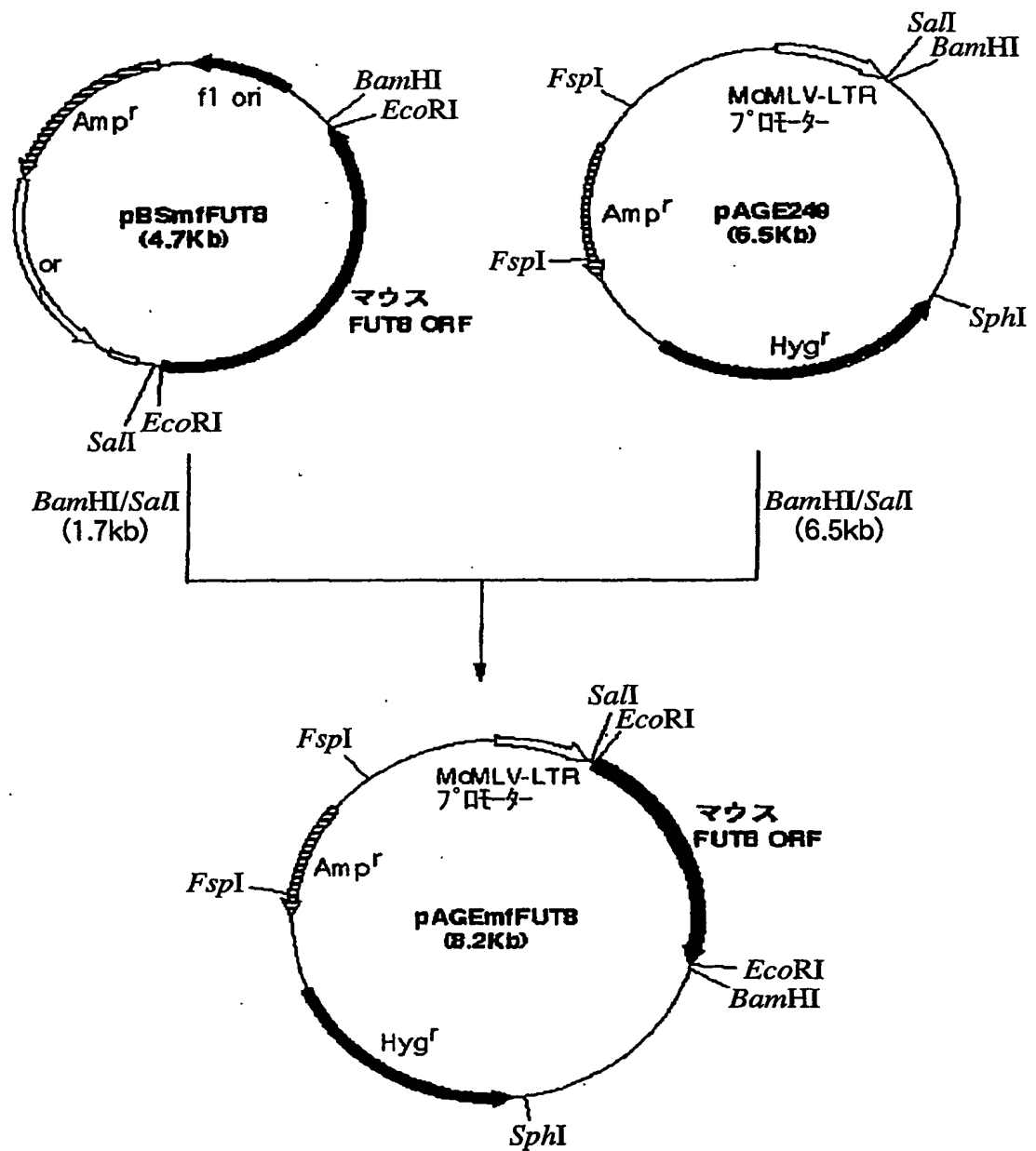
第25図



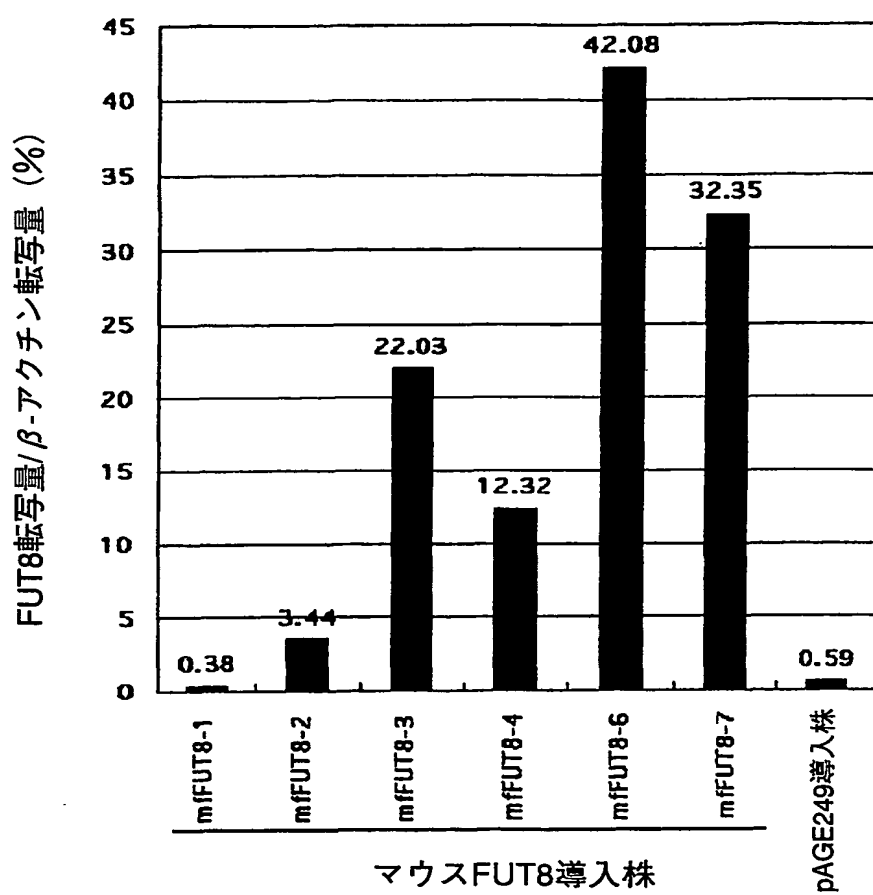
第26図



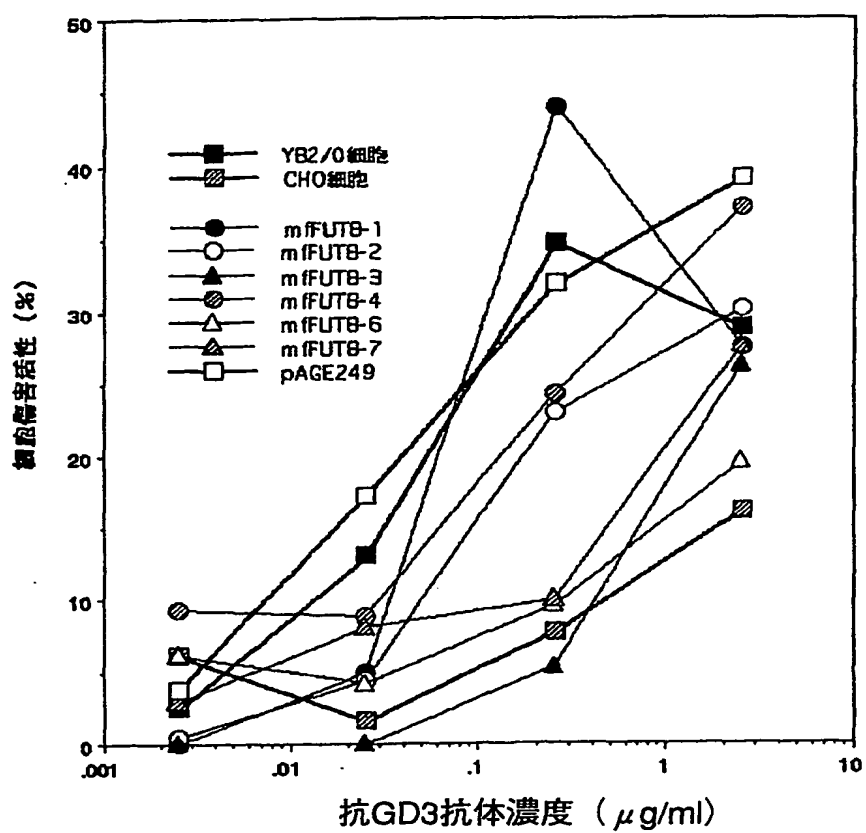
第27図



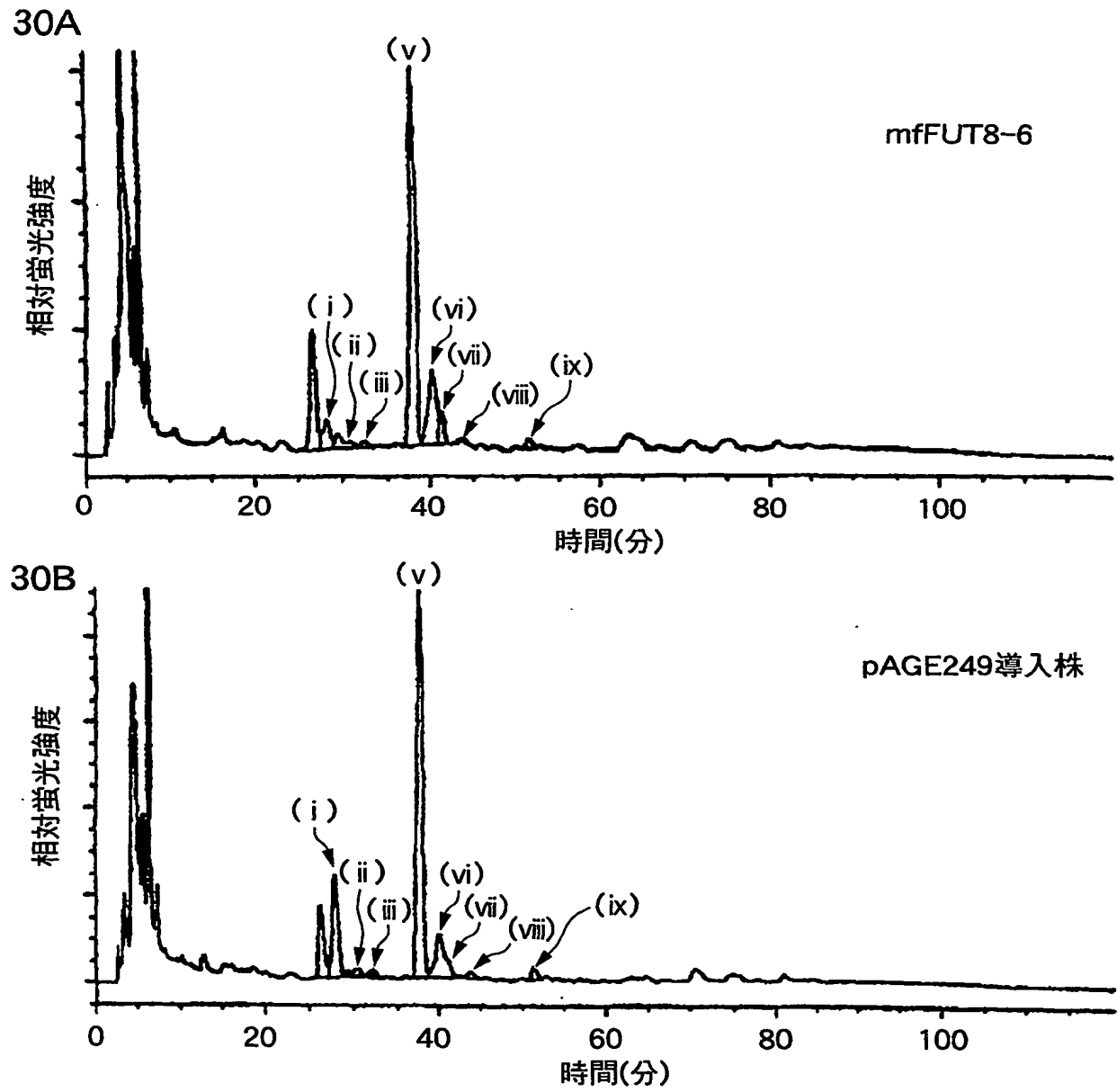
第 28 図



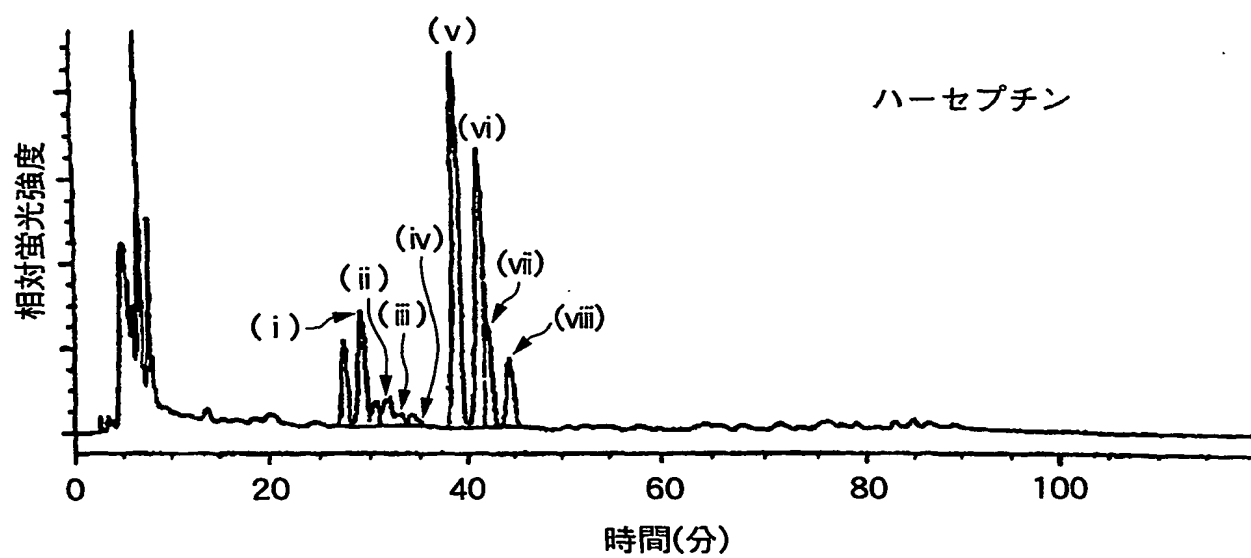
第 29 図



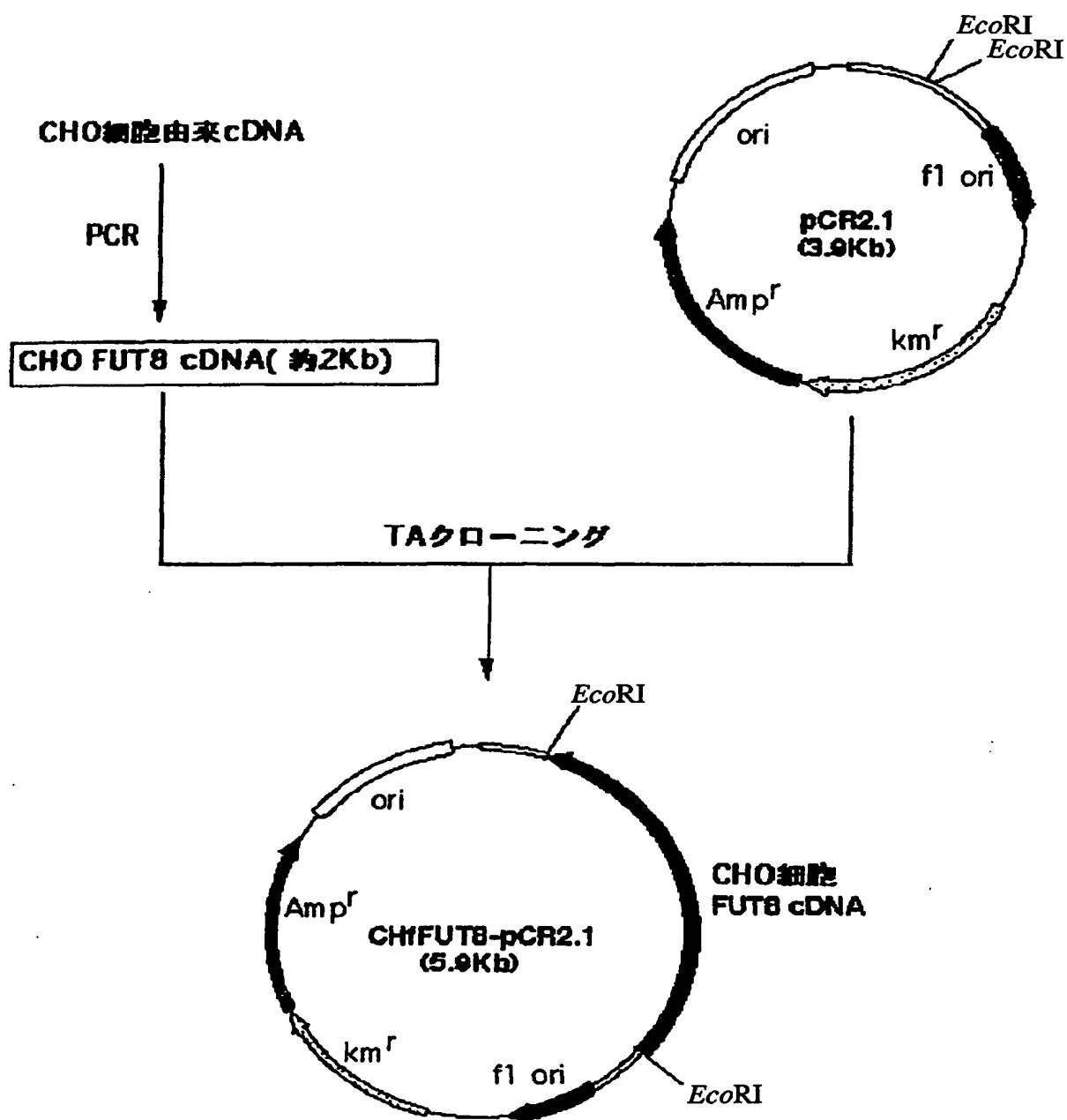
第30図



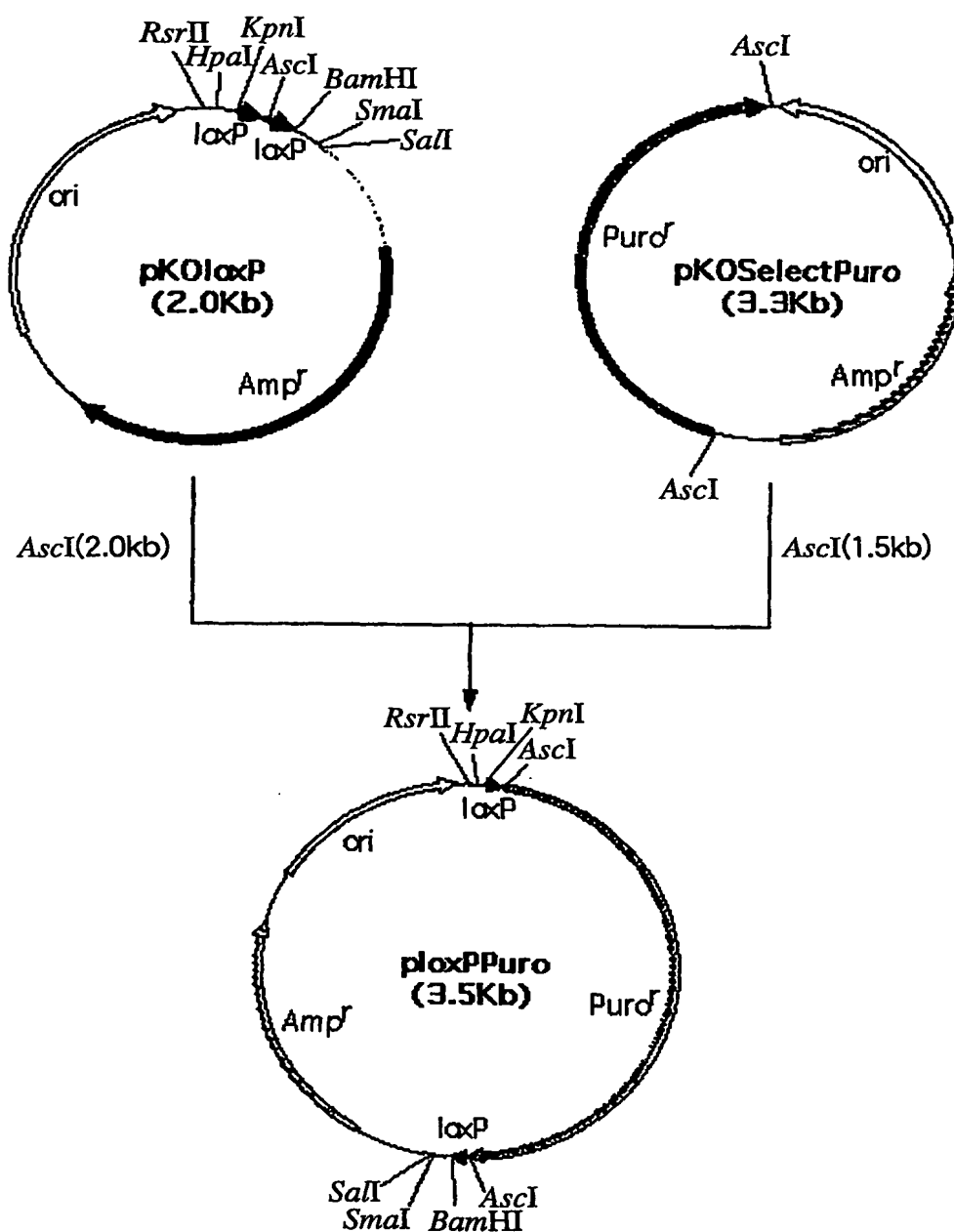
第31図



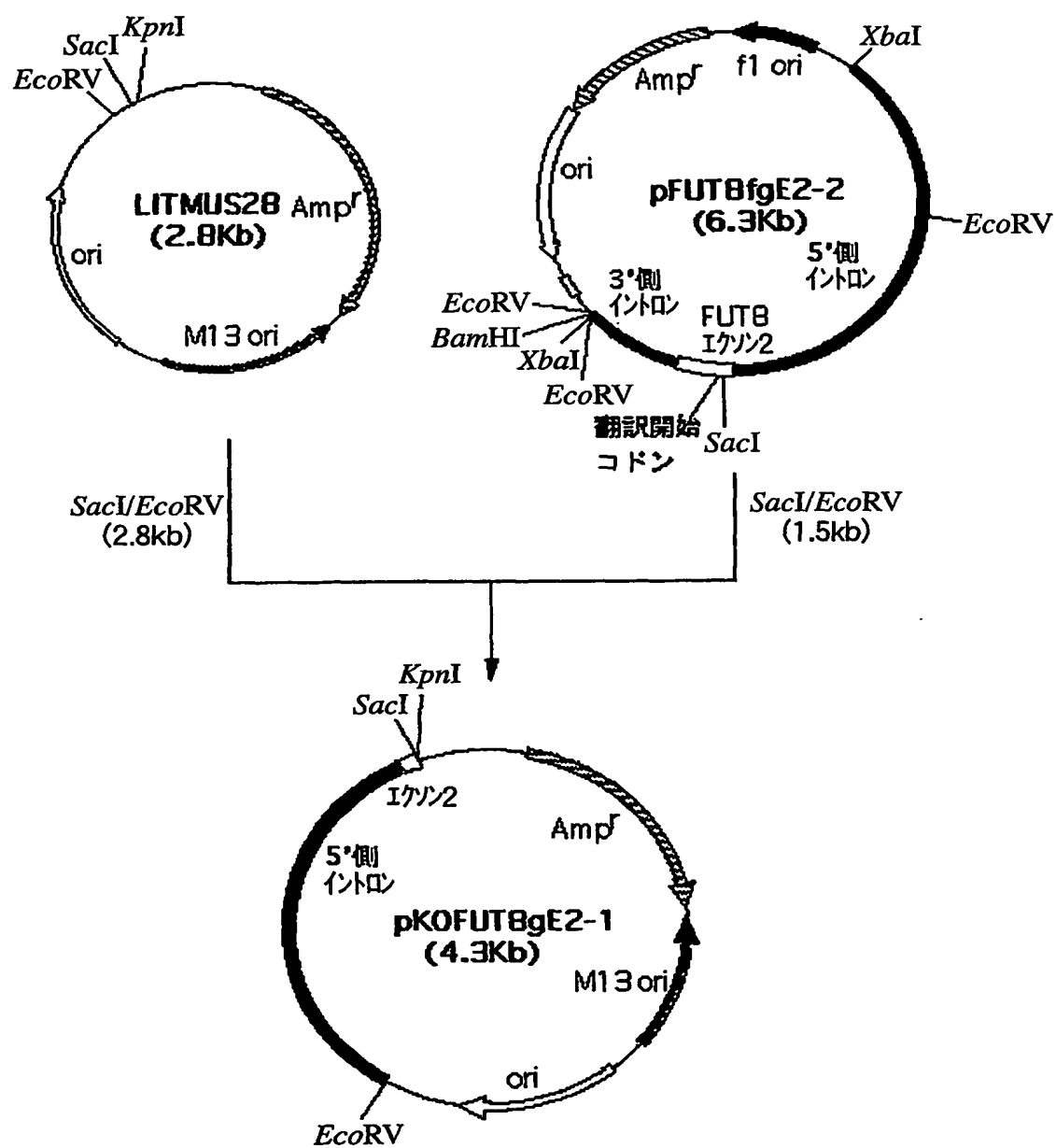
第32図



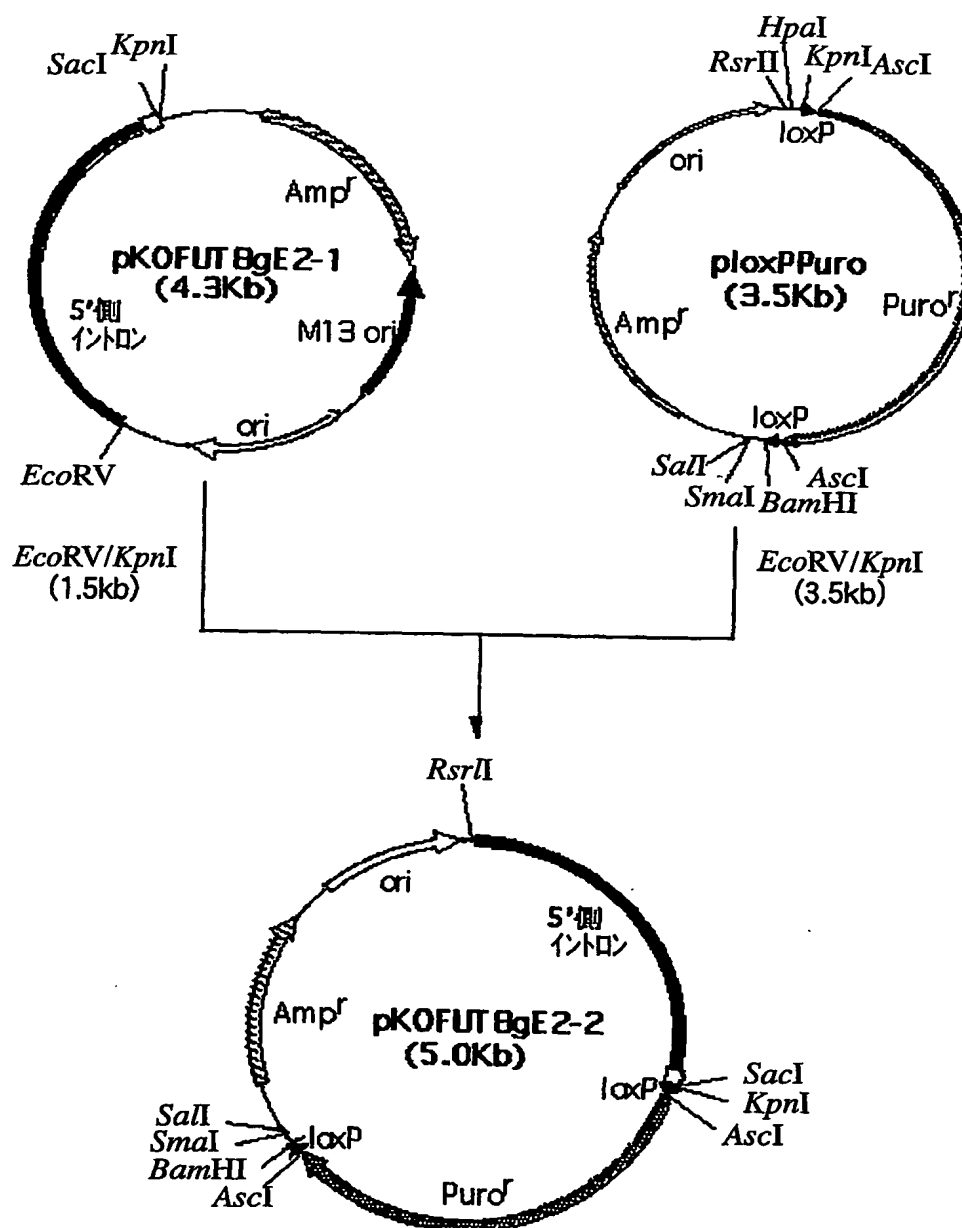
第33図



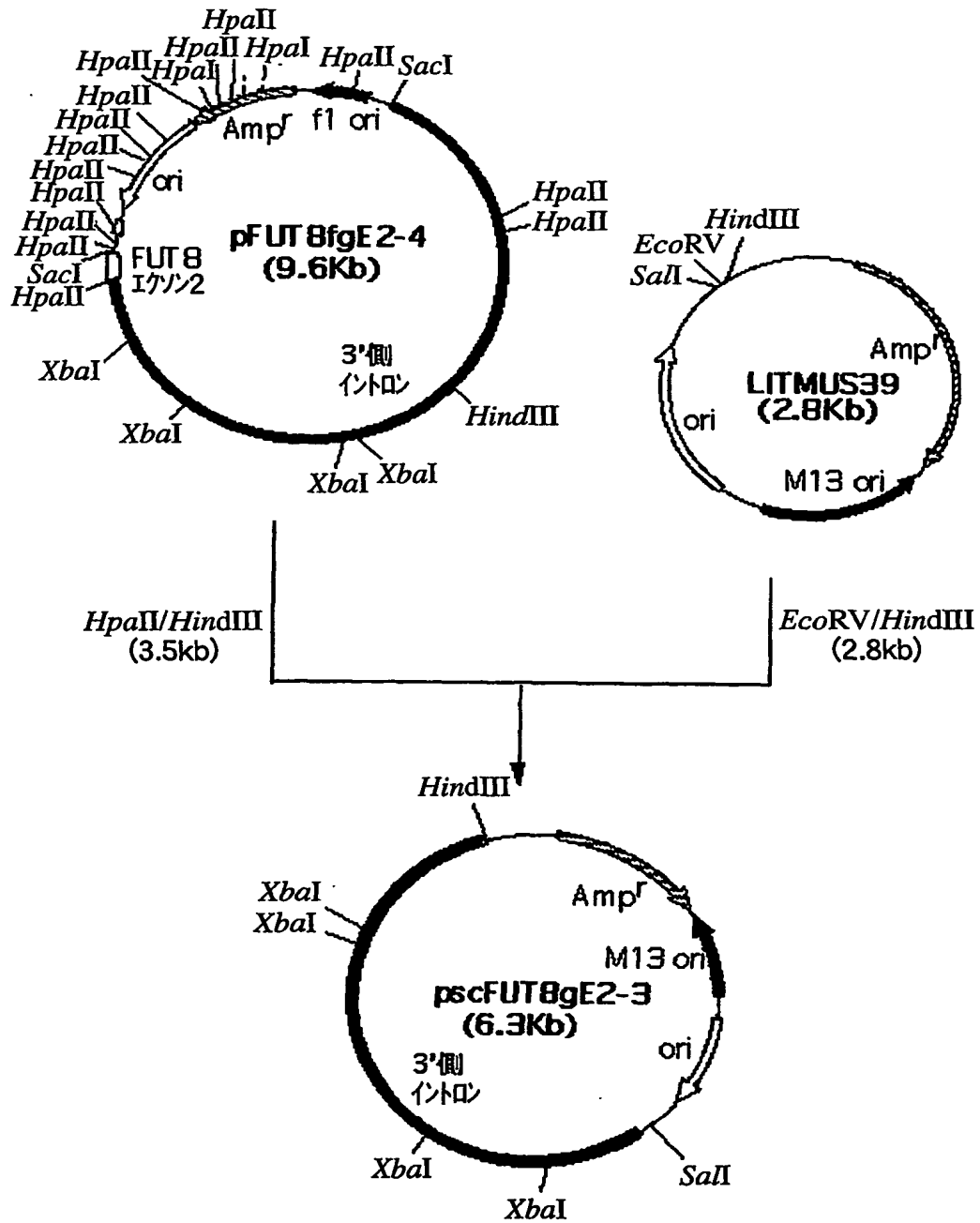
第34図



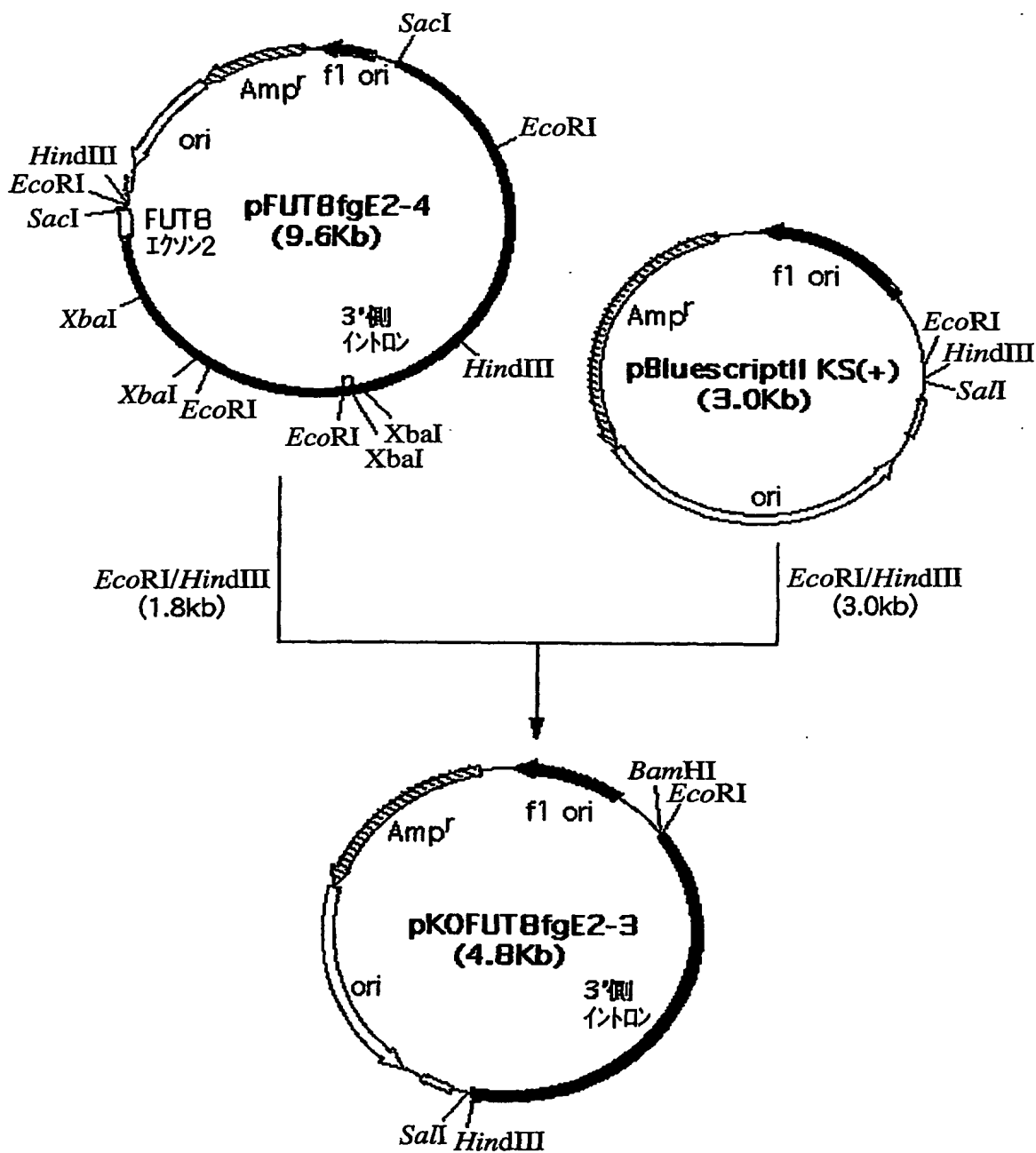
第35図



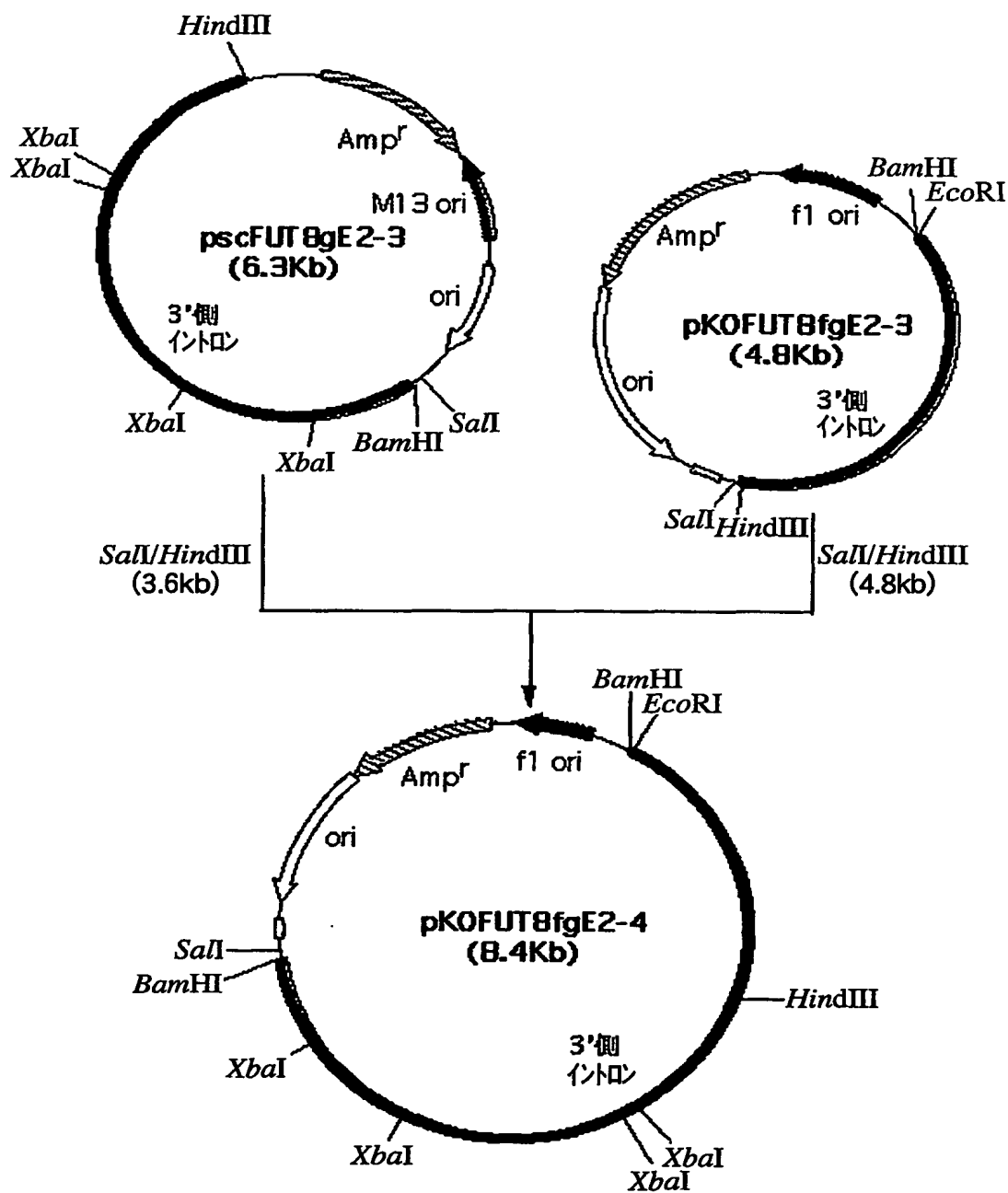
第36図



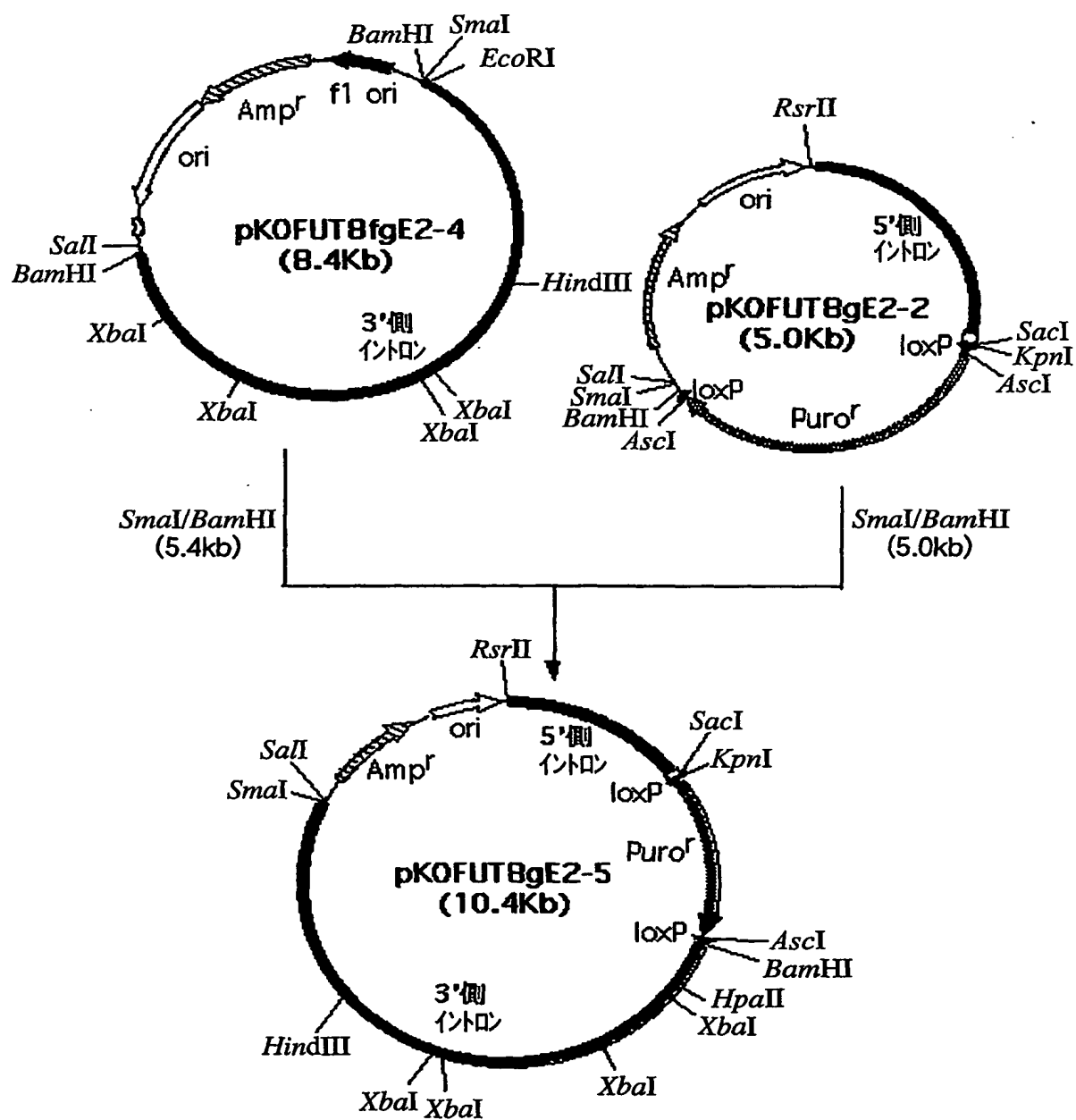
第37図



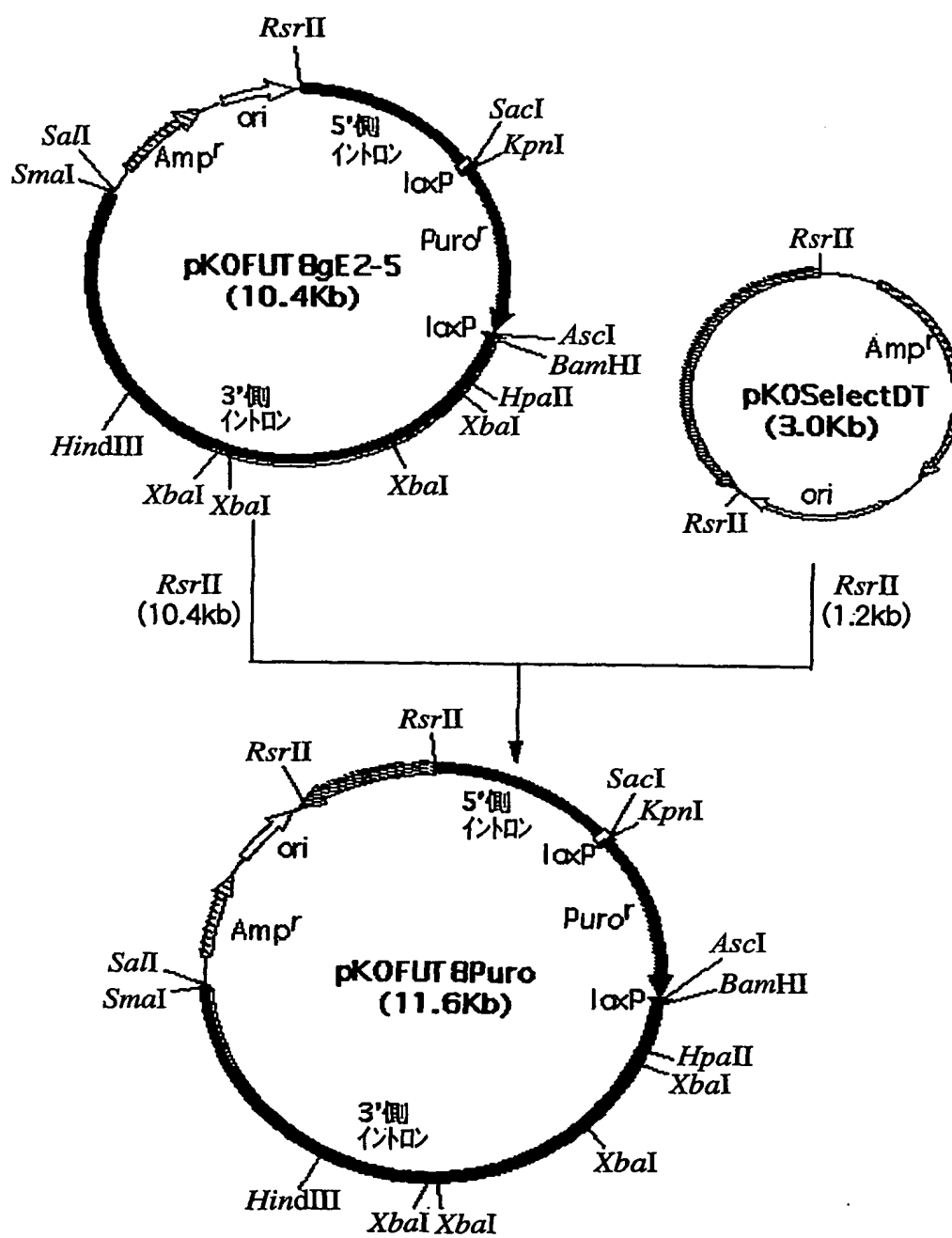
第38図



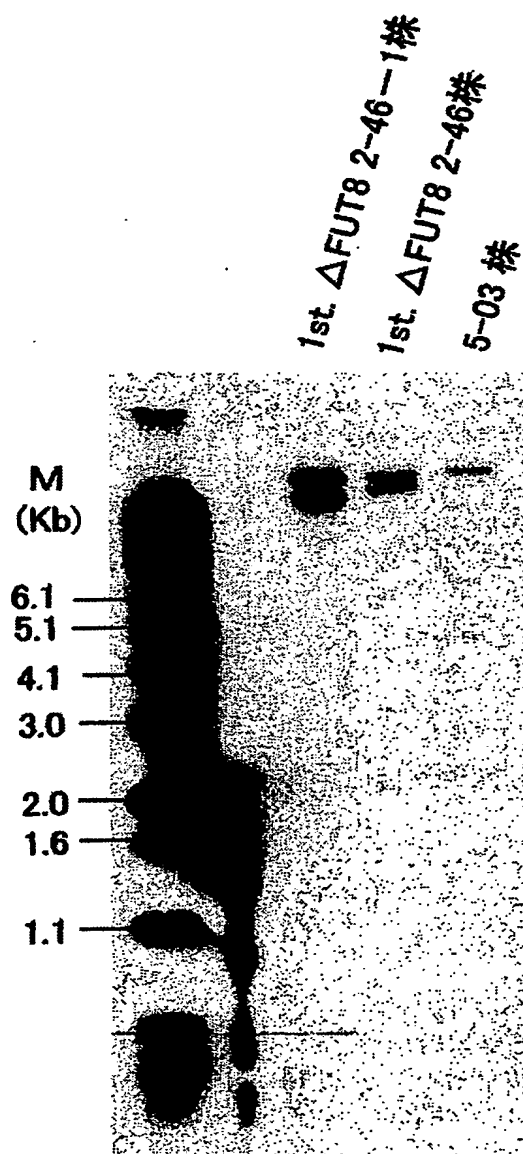
第39図



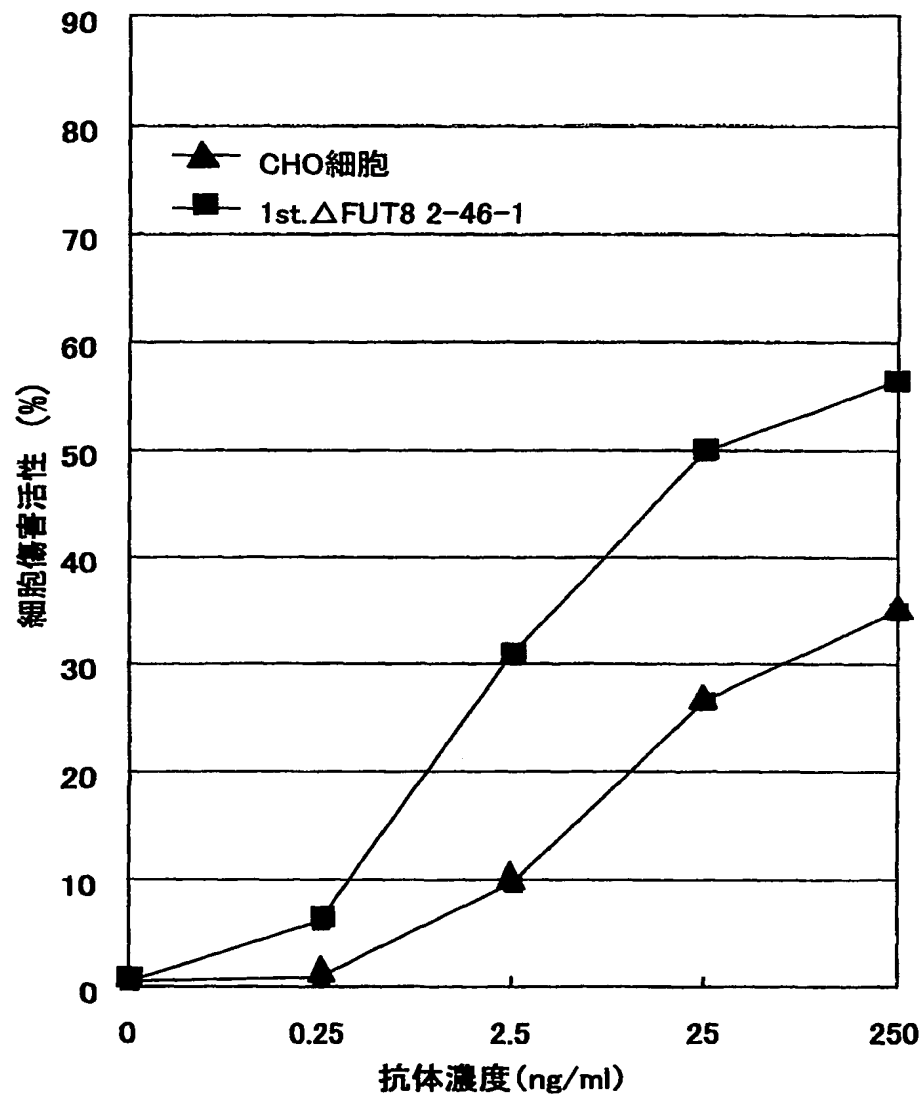
第40図



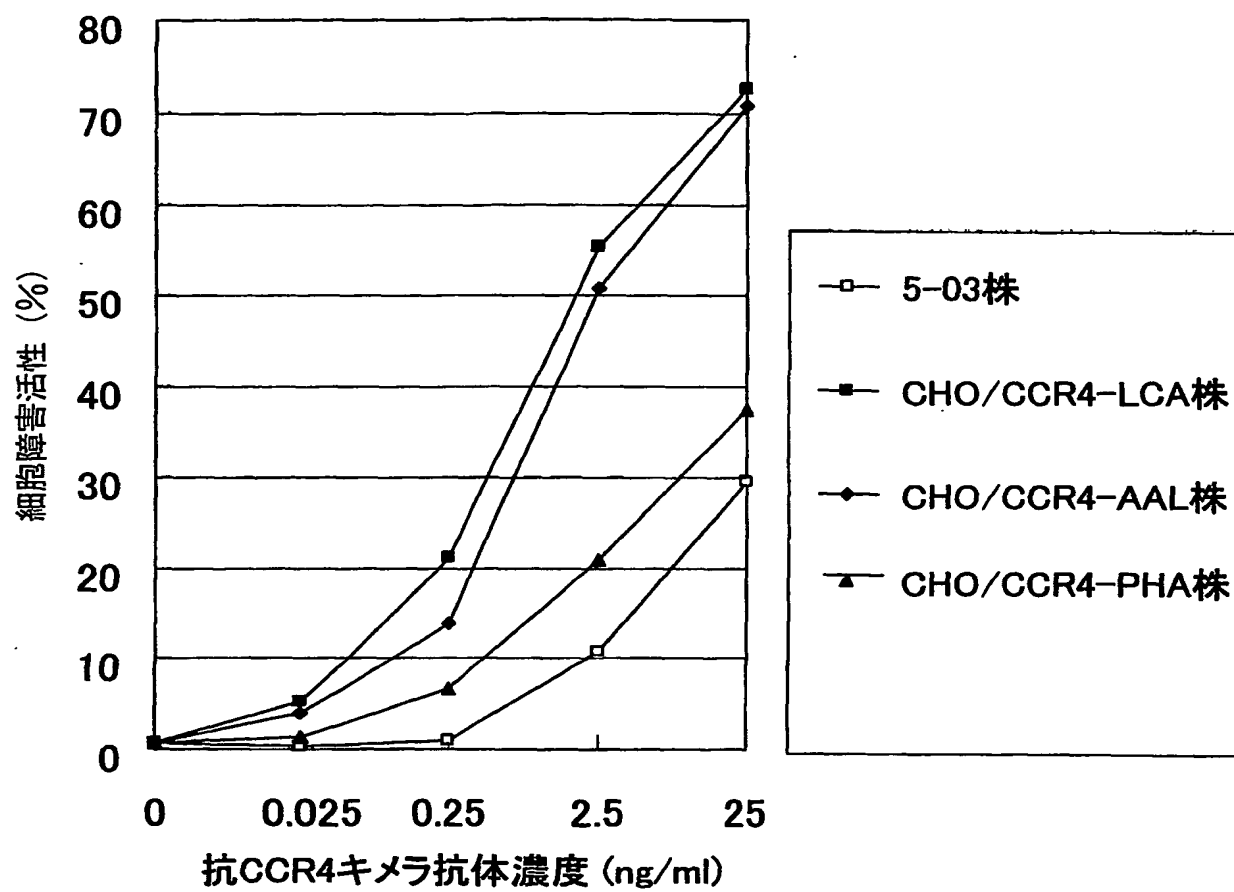
第 41 図



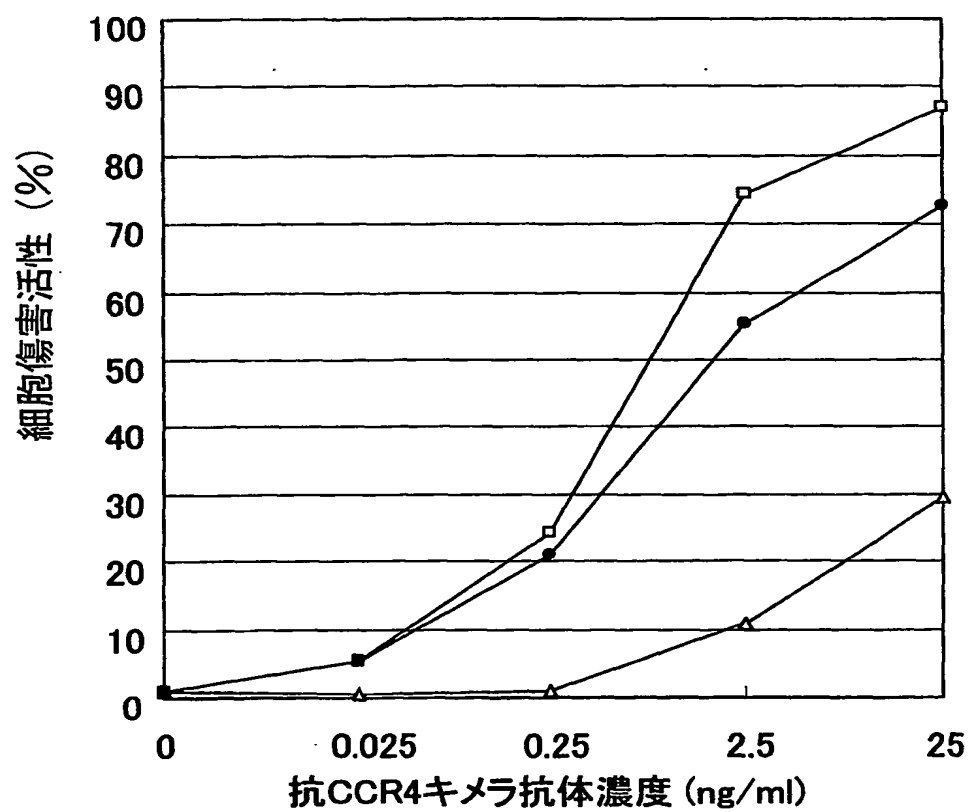
第 42 図



第 43 図



第 44 図

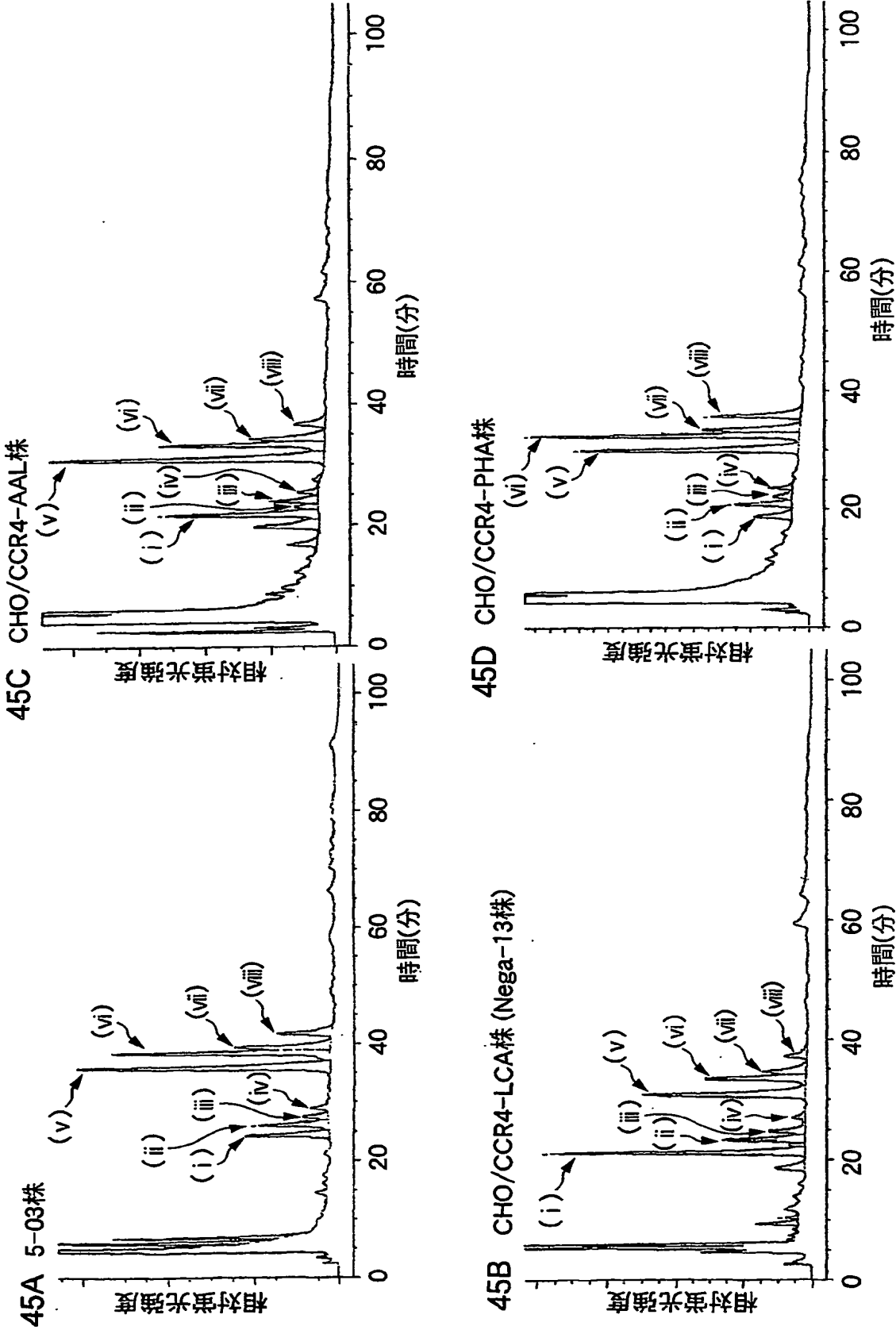


—□— YB2/0株 (KM2760#58-35-16)

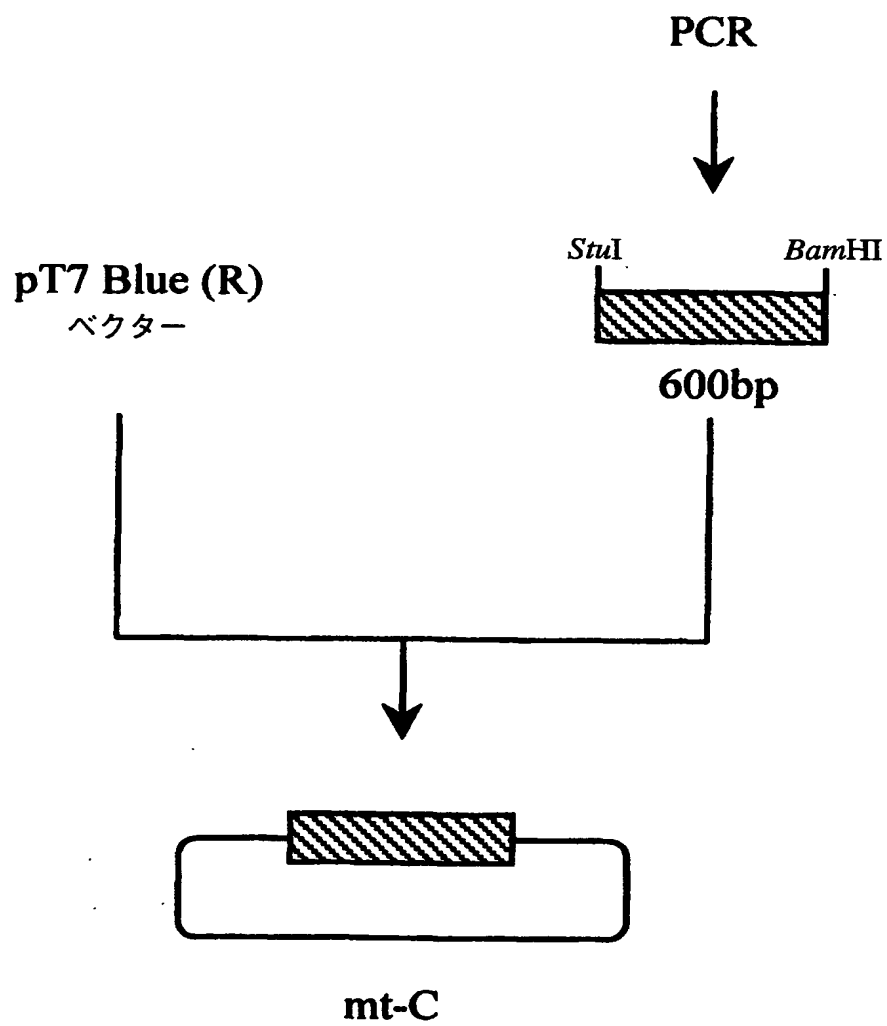
—△— 5-03株

—●— CHO/CCR4-LCA株

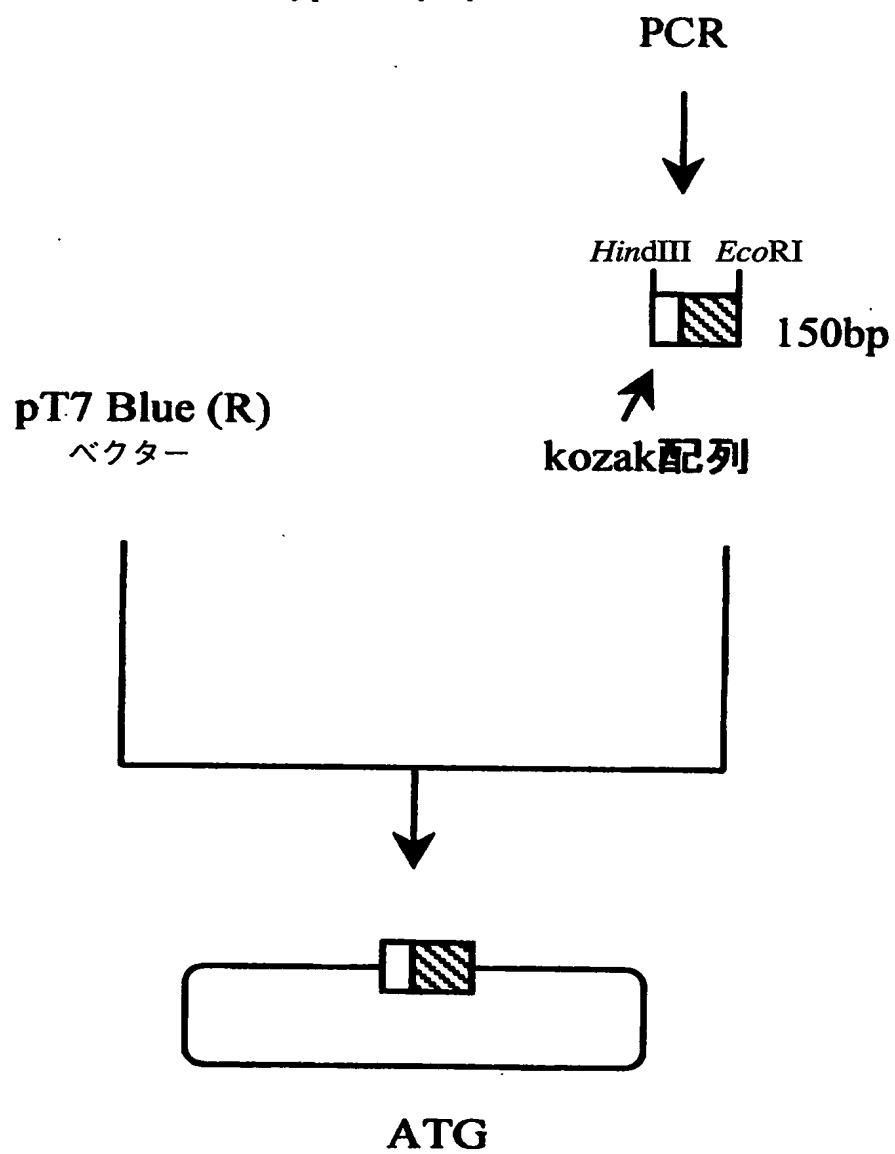
第45図



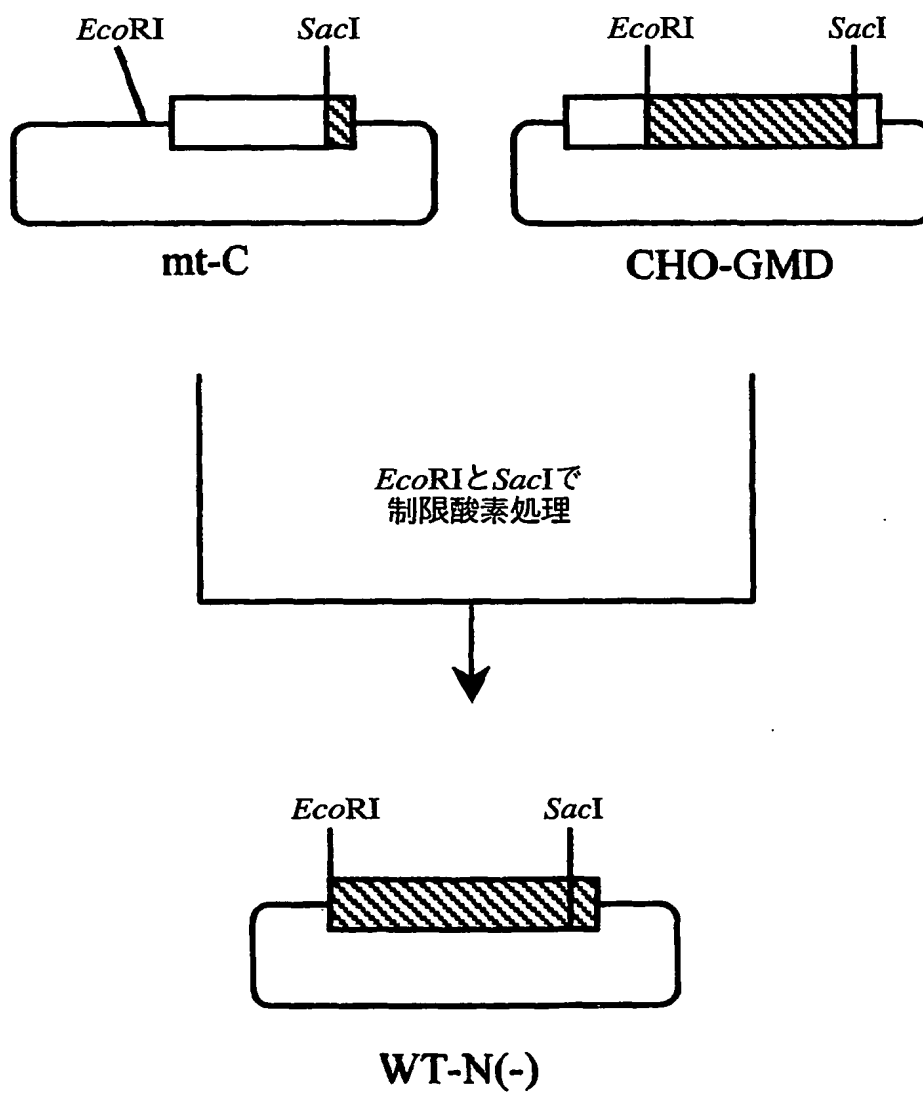
第46図



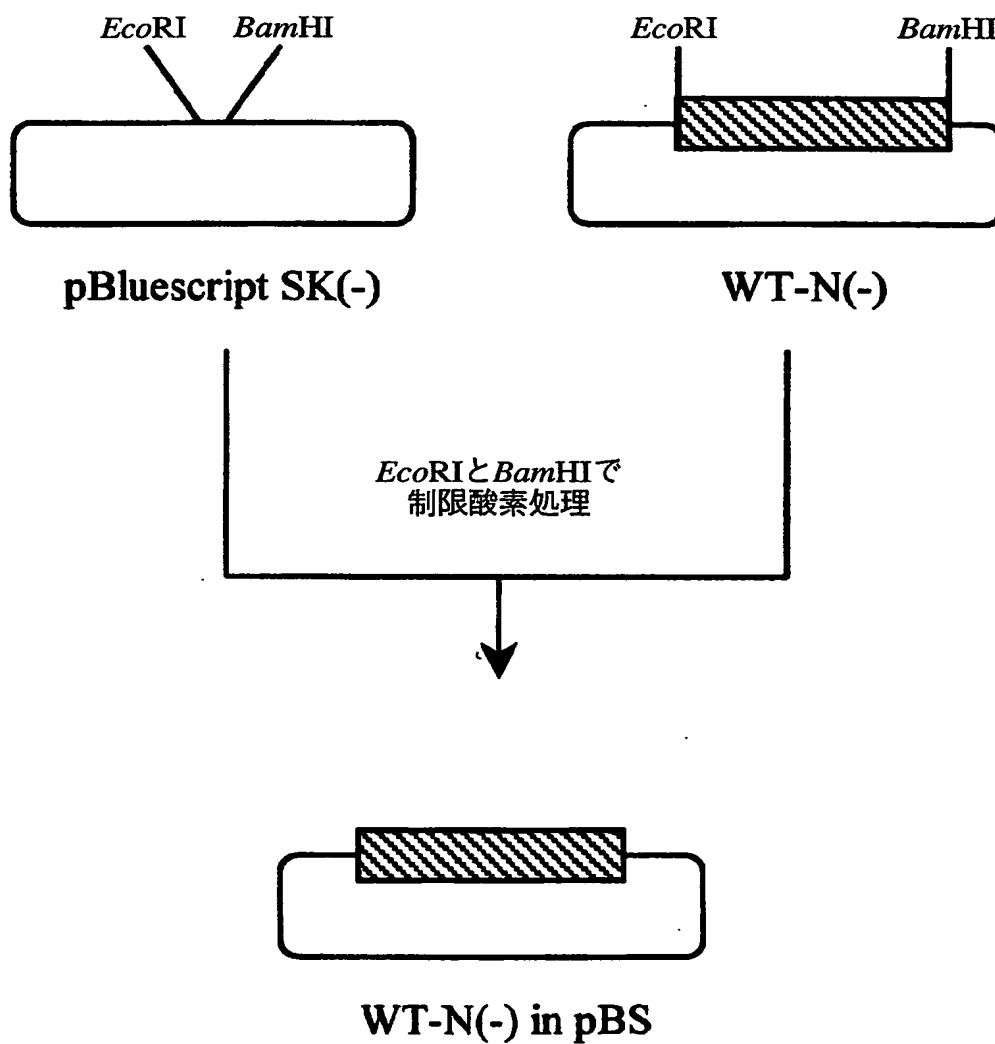
第47図



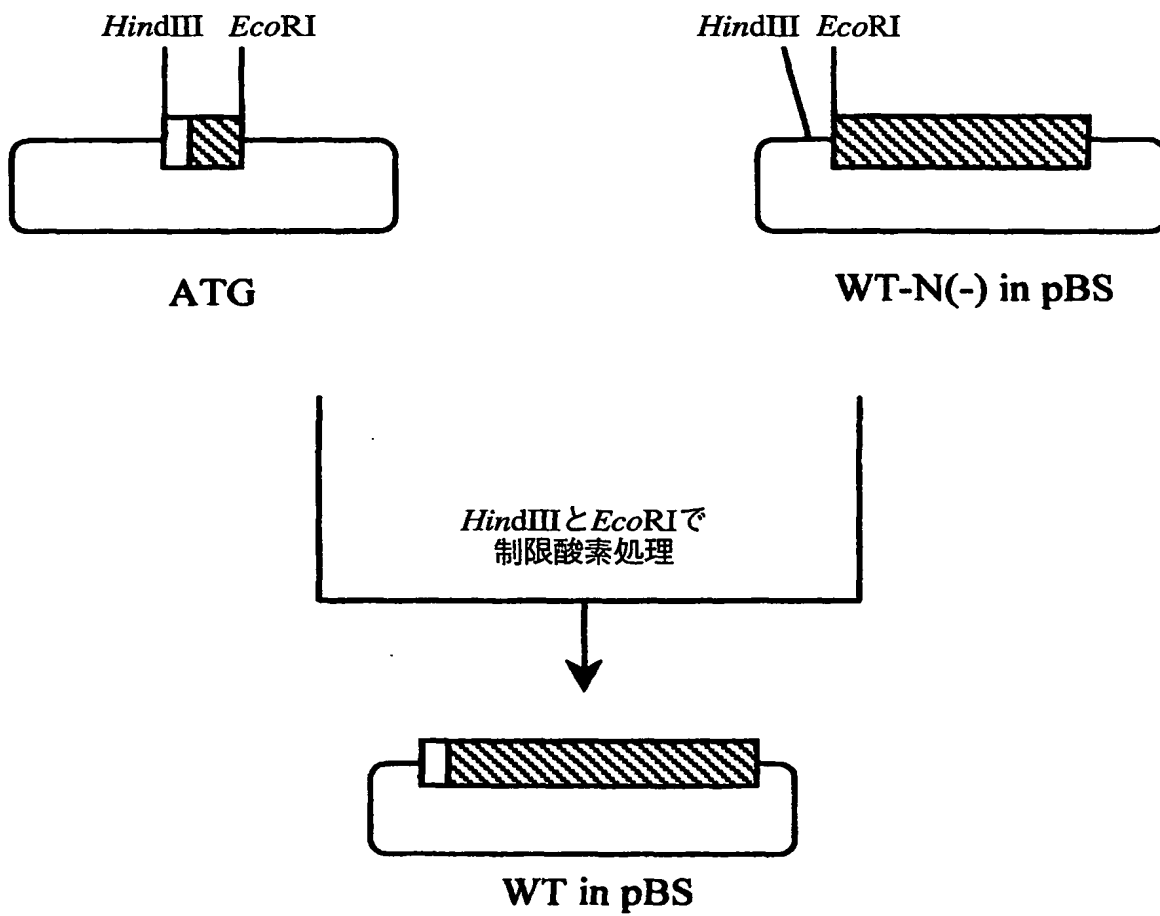
第48図



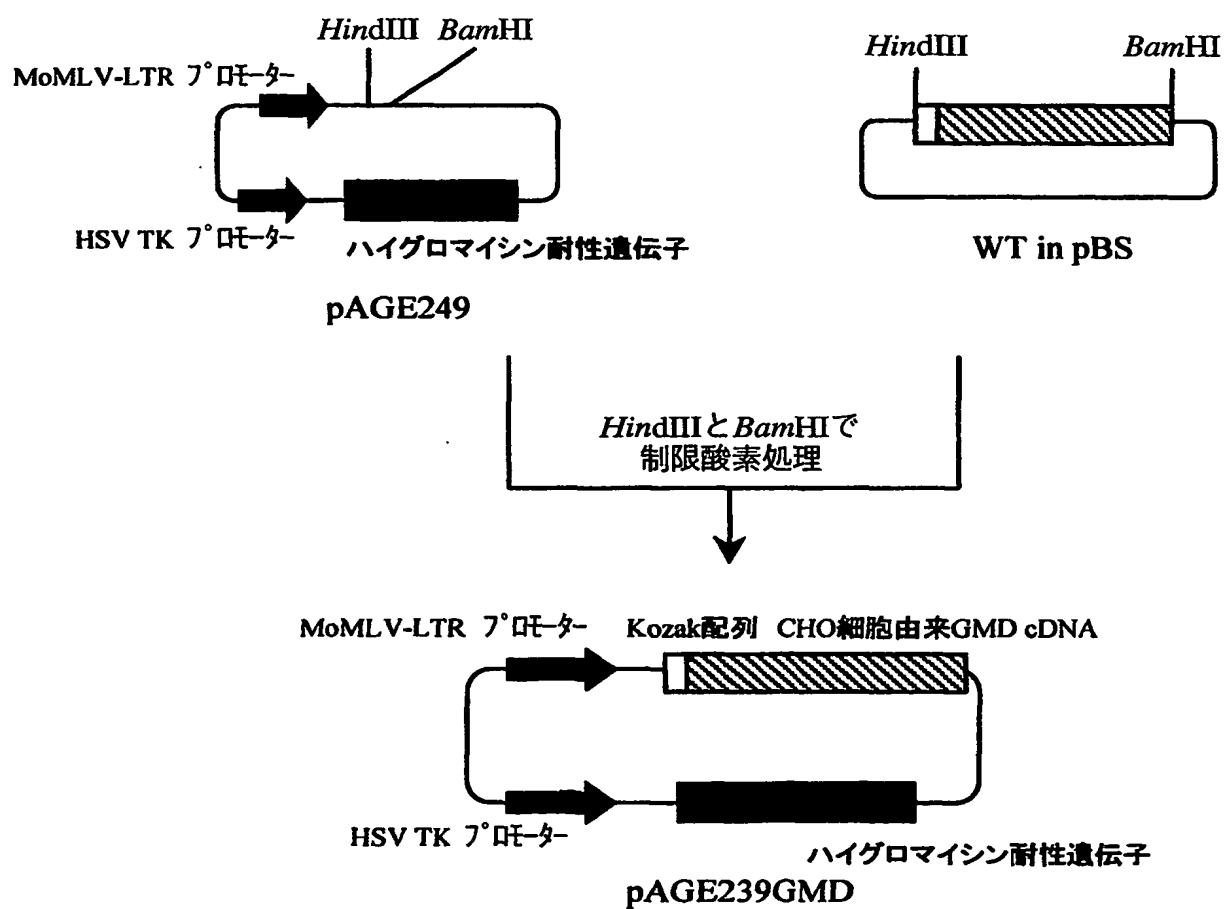
第49図



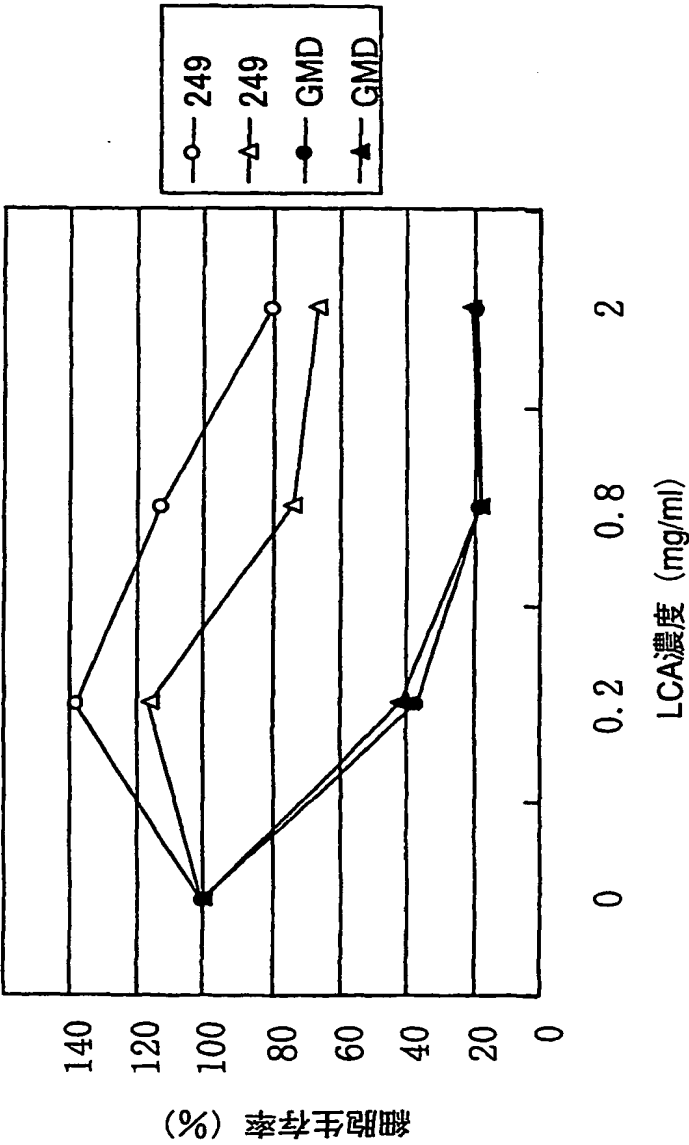
第50図



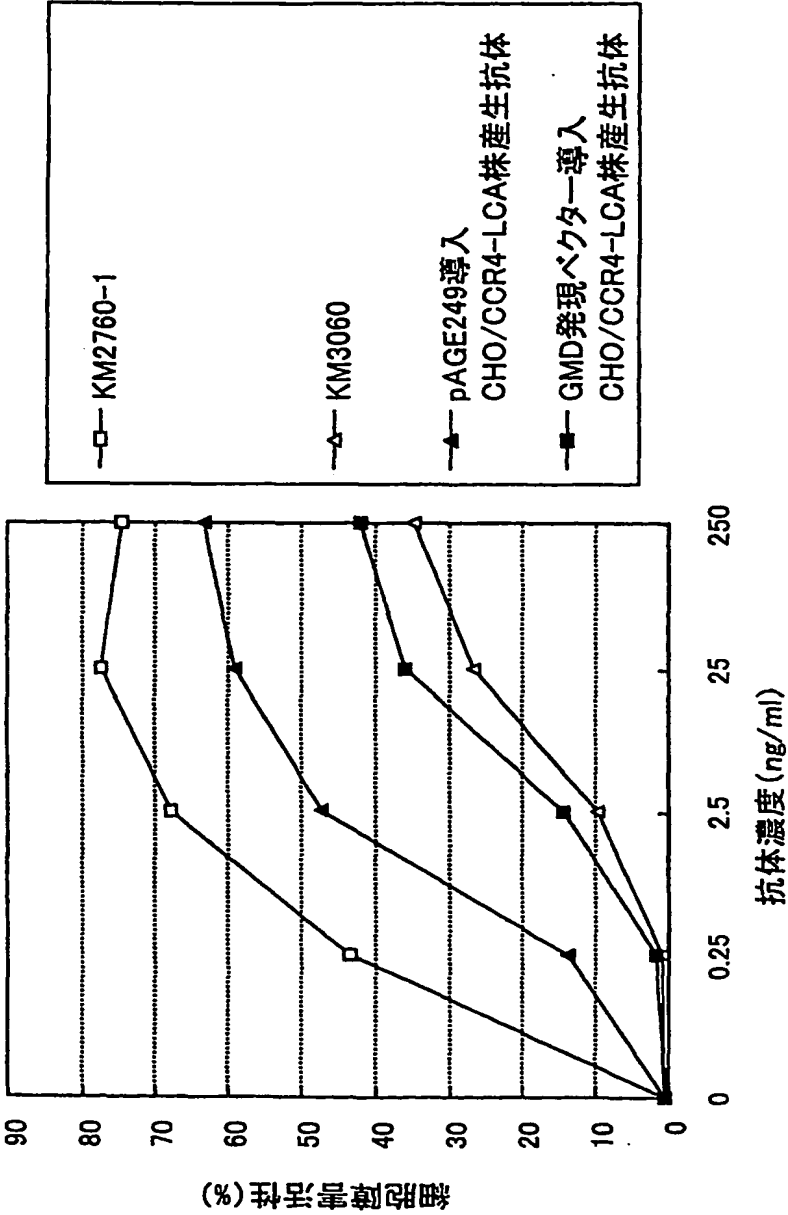
第51図



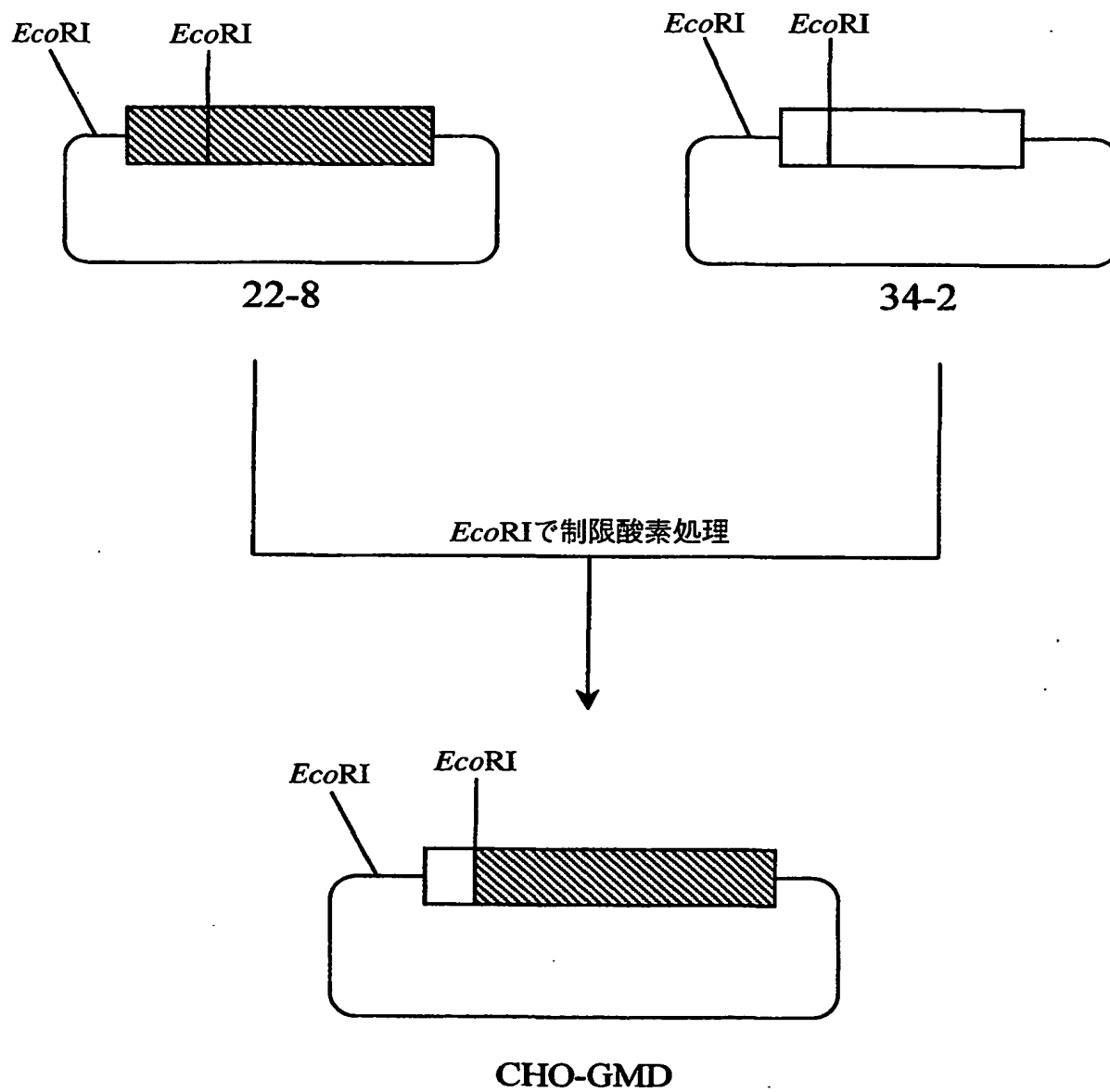
第52図



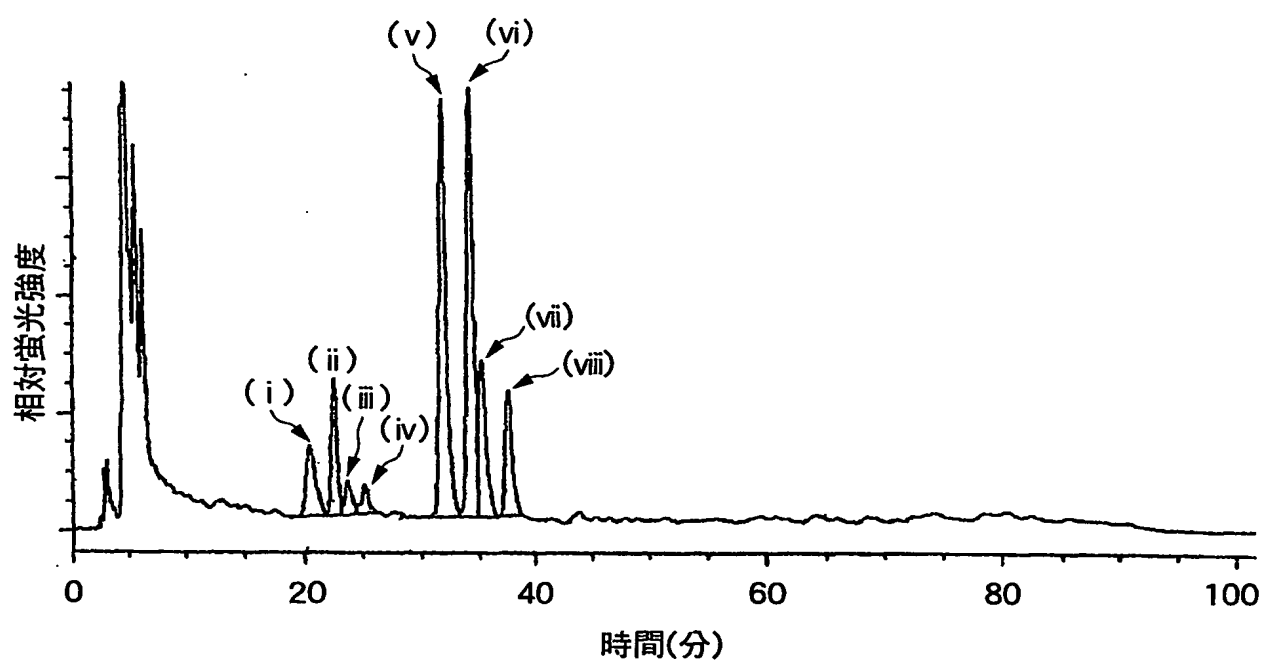
第 53 図



第54図



第55図



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

<130> P-38524

<150> JP 2000-308526

<151> 2000-10-06

<160> 73

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcggttga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccacctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtgttg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata ctgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tcccatgga acctggagat 1680
atcattggtg tggttggaac ccattggaat ggttactcta aaggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtacct ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980

gaagggctgc tgtgccctca agcccatg

2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcggttg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60
 ttgttatttt atataggttg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcactccage 120
 agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
 aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
 ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
 aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
 aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
 gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
 aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
 gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
 cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
 ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
 ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgttttaga 780
 cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
 gtaaatgaca aaaacattca agtggtcgag ctccccattg tagacagcct ccacccctcg 900
 cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
 ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020

tggctggaag aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
 ggagtcacatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
 gagtacatgg tacacgttga agaacatddd cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
 aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260
 tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatdddctt ggtcagctgg actacacaat 1320
 cgggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactdddct ctcacaggct 1380
 gactdddctag tgtgtactddd ttcaccccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcacg ctgatgcctc tgcgaacttc cattctdddgg atgacatcta ctatdddtga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgtctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga tatcattggg gtggctggaa accattggga tggttattdt 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3

<211> 9196

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

tctagaccag gctgggtctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tattdddttgaa tattgtgata 120
 atttacatta taattgtaag taaaaatddd cagcctatddd tgttatacat tdddgcgtaa 180
 attattdddd ttdgaaagtt ttdttdtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240
 tdddgtctat gtatdddcat atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300
 ggtatgtaat agcttcaaca tgtggtatga tagaatddd cagtgtctata taagttgtta 360

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420
atccttaage tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagcccaaa tctgttcatt 480
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540
ggccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600
gatgagtctt gtgaccttag tttcttttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca ttttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttgga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggg 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttcttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttttaattgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaag ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620

ttttaaatac atagccaccc taagggttta actgttgta gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacaicatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatgggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtgggtg ccaattgggt gatggttatg 1860
ataacctttg ctctcttaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt ctttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaataactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940

ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcatt cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660
aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcgggtg gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtag 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaatTTTtatt 4200

taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260
gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620
cgatttcta tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagt ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagtttatt cagattacat ttttaaggta taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttcctgtgct cagctcactt ttcctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tggctctcta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520

gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaaagcagt taccoaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttggt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggtatatat ttctatattc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctggtagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaattttgtg 6300
ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atttttttgt ttgatctggt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaactt tatatagcat 6600
gttgtttggt aggtagttga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaataactaac tccgtactat 6780

cttgttttct gtgaattaac cccittttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
aacaagttta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtgggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt ttttagtta 7320
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgatatt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttattttttt tattttaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctcccct cctcccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggt 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga ctccctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag ccggtcttg accccttgct tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tcgttccatc agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagttct attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaacctgt aggtctctgg 8100

acagtgcag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160
 tgctctcatc cgttctctcc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
 tccccctctc cccttctctt tcttctaaact ccctctcccc tccacccacg atccccatta 8280
 gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
 aatatgctta tatcaggttt attttggtta gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400
 accttaattg acatgtatcc ttatatattag acacagattt aaatatattga agtttttttt 8460
 tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
 caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
 gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
 gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
 actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
 ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
 ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
 gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
 gtcataattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
 aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060
 caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120
 atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
 aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg 25

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

cttgaccgtt tctatcttct ctcg 24

<210> 6

<211> 979

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 6

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgttttag 60
 acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
 agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180
 tcctcettac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240
 tggtgatcct gcagtgtggt gggtatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300
 ttggctggaa agggaaatag aagaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360
 tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420
 ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480

taaaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
 gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
 ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctcccaggc 660
 tgacttcctt gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aaatcatgca 720
 aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780
 aggccaaaat gccacaaacc agattgcagt ttatcctcac caacctcgaa ctaaagagga 840
 aatcccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900
 taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaaac aggctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960
 gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 7

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggg ggatgggaga ctgtgttttag 60
 acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcagggtga 120
 agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcacccctg 180
 gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240
 tggtgatcct gcagtgtggg ggggtgtcca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
 ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360
 tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420
 agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
 taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
 tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660
 tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggictgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720
 aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actattttgg 780
 aggccaaaat gccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
 aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
 taaaggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960
 gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt 40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg 40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg

40

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ctccaattat gaatttatta gtg

23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggatgtttga agccaagctt cttgg

25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gtccatggtg atcctgcagt gtgg

24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gatatcgctg cgctcgttgt cgac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagc

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gatatcgctg cgctcgctgt cgac

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

atgcgggcat ggactggttc ctgg

24

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

ctatTTTTca gcttcaggat atgtggg

27

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

gtctgaagca ttatgtgttg aagc

24

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

gtgagtacat tcattgtact gtg

23

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 23

Met	Arg	Ala	Trp	Thr	Gly	Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Met	Leu	Ile	Leu	Phe
1				5					10					15	

Ala	Trp	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	Tyr	Ile	Gly	Gly	His	Leu	Val	Arg	Asp
			20						25				30		

Asn	Asp	His	Pro	Asp	His	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Leu	Ala
		35					40					45			

Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Met	Ala
	50					55					60				

Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Pro	Glu	Gly	Pro	Ile	Asp	Gln	Gly	Thr	Ala	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65		70		75		80
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln						
		85		90		95
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His						
		100		105		110
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe						
		115		120		125
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu						
		130		135		140
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu						
145		150		155		160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala						
		165		170		175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln						
		180		185		190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg						
		195		200		205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu						
		210		215		220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr						
225		230		235		240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu						
		245		250		255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu						
		260		265		270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val						
		275		280		285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu						
		290		295		300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Cys

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

cttggtgac tcttaactct cagag 25

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

ccctcgagat aacttcgtat agc 23

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

aggaaggtgg cgctcatcac gggc

24

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

taaggccaca agtcttaatt gcatcc

26

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

caggggtgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

ggcaggagac caccttgcca gtgcccac

28

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

ggcgctggct taccggaga ggaatggg

28

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg

28

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

cgcgatcct caagcgttg ggttggtcc

29

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

cccaagcttg ccaccatggc tcacgtccc gctagctgcc cgagc

45

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

ccggaattct gccaaagtatg agccatcctg g

31

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gccatccaga aggtggt

17

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

gtcttgtcag ggaagat

17

<210> 44

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 44

ggcaggagac caccttgcca gtgcccac

28

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 45

gggtgggctg taccttctgg aacagggc

28

<210> 46

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 46

ggcgctggct taccggaga ggaatggg

28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

ggaatgggtg tttgtctctc caaatgac

28

<210> 48

<211> 1316

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 48

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60

tggactgggtg gaacctgacg caggtgcagc acaatgggt gagccccagg gatccaggag 120

gacccctagt acagggggct ctggactgggt gggcagagct atccagaagg tggcgcaga 180

tggcgctggc ttaccggag aggaatgggt gttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240

ggatgcagca caaacccaag cctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300

tgctgcaatg gtaggaggcc tttccggaa tatcaatac aacttgatt tctggaggaa 360

gaatgtgac atcaatgaca acgtcctgca ctgagcttc gaggtgggca ctgcaagggt 420

ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480

aatgatccac aatgggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtagt ccaagaggat 540

gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600

ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgtgtcc 660

tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
 tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
 ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
 agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtgggggaagt 900
 cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
 tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
 tgccctggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
 tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca ttgcttgtc aagaactgag 1140
 gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
 atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260
 ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

gatcctgctg ggaccaaaat tgg

23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg

22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 51

acggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60
 tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120
 ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180
 agctgaagag aaaggaattg ccccttgag ttaactacca tgttttctact gacccctctg 240
 gaacccaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300
 atggagacaa gtggaattcc ttcacagtcc tgttaattca ctctgggtggc tacagtcaac 360
 gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420
 tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttccctca cgcatgaagc 480
 ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540
 ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600
 gcaccacaca tggagtatth gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660
 agtacaggca atgccaccgt ttcctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720
 atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagggggggt gacaccacct 780
 gtcattcatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840
 cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtagggcc actgaactgt gaaatagatg 900
 cctatgggtga ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960

cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020
 tcctcaaggg aacaccctg aatgttggtg tccttaataa ctccagggtt tatcacattg 1080
 gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cticcaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140
 gcttgcaatc catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
 cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260
 aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcgaaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
 tcatagaaaa agctgttctg ccccatgtt ctttcgtgtg ctctttaagt gtggagataa 1380
 atggacactt agaatattca actatgggtg ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
 ttaaaacat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttggt 1500
 tagatatattg gaaccttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560
 gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttcttctct gattgagtcg gttgcagcat 1620
 cccttgggat gttaaagcc attcgaaacc attgccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680
 tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
 agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatcttaaa 1800
 tacaatggat ttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctctgg 1860
 gttcttcttt ctttctcccc tctctccttt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
 aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1965

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52

caggggtgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

cactgagcca ggggccacac agcatcc

27

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55

tgccaccgtt tcctccataa gccccagc

27

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga

28

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

tcaagcgttt gggttgtcc tcatgag

27

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

tccggggatg gcgagatggg caagc

25

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

cttgacatgg ctctgggctc caag

24

<210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60
ccacttcagt cggtcggtag tattt 25

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61
cgctcaccgc cctgaggcga catg 24

<210> 62
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62
ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc 32

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

ggggccatgc caaggactat gtcg

24

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

atgtggctga tgttacaaaa tgatg

25

<210> 65

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 65

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp

1

5

10

15

ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr

20

25

30

ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr

35

40

45

gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg

50	55	60	
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg			240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met			
65	70	75	80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc			288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile			
85	90	95	100
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc			336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser			
	105	110	115
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat			384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp			
	120	125	130
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt			432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu			
	135	140	145
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga			480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly			
	150	155	160
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg			528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac			576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
	185	190	195
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat			624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
	200	205	210
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc			672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
	215	220	225
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg			720

Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Cys	Phe	Ser	Leu		
230						235					240						
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc 768																	
Gly	Asn	Leu	Asp	Ala	Lys	Arg	Asp	Trp	Gly	His	Ala	Lys	Asp	Tyr	Val		
245					250					255					260		
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc 816																	
Glu	Ala	Met	Trp	Leu	Met	Leu	Gln	Asn	Asp	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Val		
				265					270					275			
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca 864																	
Ile	Ala	Thr	Gly	Glu	Val	His	Ser	Val	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Lys	Ser		
			280					285					290				
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat 912																	
Phe	Met	His	Ile	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Glu	Gly	Lys	Asn	Glu	Asn		
		295					300					305					
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat 960																	
Glu	Val	Gly	Arg	Cys	Lys	Glu	Thr	Gly	Lys	Ile	His	Val	Thr	Val	Asp		
	310					315					320						
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008																	
Leu	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Thr	Glu	Val	Asp	Phe	Leu	Gln	Gly	Asp	Cys		
325					330					335					340		
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056																	
Ser	Lys	Ala	Gln	Gln	Lys	Leu	Asn	Trp	Lys	Pro	Arg	Val	Ala	Phe	Asp		
				345					350					355			
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104																	
Glu	Leu	Val	Arg	Glu	Met	Val	Gln	Ala	Asp	Val	Glu	Leu	Met	Arg	Thr		
			360					365					370				
aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatggtg 1159																	
Asn	Pro	Asn	Ala														
			375														
cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219																	
cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279																	
actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339																	
caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaata 1399																	

ttttgagtct tgagattggt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66

atgaagttgc actatggtga cctca 25

<210> 67

<211> 59

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 67

ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

gacttagcag agtacactgc agatg 25

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

accttgata gaaaggggtg gtctc

25

<210> 70

<211> 125

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 70

ttgatggagt tggcaccttg cggcttcttg atgcaattaa gacttggtggc cttataaatt 60
 ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaataccccc 120
 agaaa 125

<210> 71

<211> 376

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 71

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95 100

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 105 110 115

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 120 125 130

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 135 140 145

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175 180

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 185 190 195

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 200 205 210

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 215 220 225

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255 260

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 265 270 275

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 280 285 290

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 295 300 305

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335 340

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 345 350 355

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 360 365 370

Asn Pro Asn Ala
 375

<210> 72

<211> 321

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 72

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 73

<211> 590

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 73

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser

1	5	10	15
Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val	20	25	30
Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln	35	40	45
Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr	50	55	60
His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser	65	70	75
Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp	85	90	95
Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg	100	105	110
Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu	115	120	125
Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met	130	135	140
Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp	145	150	155
Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu	165	170	175
Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly	180	185	190
Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His	195	200	205
Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser	210	215	220
Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe	225	230	235
			240

Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His
 245 250 255

Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser
 260 265 270

Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys
 275 280 285

Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala
 290 295 300

Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser
 305 310 315 320

His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr
 325 330 335

Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly
 340 345 350

Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln
 355 360 365

Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val
 370 375 380

Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn
 385 390 395 400

Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val
 420 425 430

Ile Glu Lys Ala Val Leu Pro Pro Cys Ser Phe Val Cys Ser Leu Ser
 435 440 445

Val Glu Ile Asn Gly His Leu Glu Tyr Ser Thr Met Val Phe Gly Met
 450 455 460

Glu Asp Asn Leu Lys Asn Ser Val Lys Thr Ile Ser Asp Ile Lys Met
 465 470 475 480

Leu Gln Phe Phe Gly Val Cys Phe Leu Thr Cys Leu Asp Ile Trp Asn
 485 490 495

Leu Lys Ala Met Glu Glu Leu Phe Ser Gly Ser Lys Thr Gln Leu Ser
 500 505 510

Leu Trp Thr Ala Arg Ile Phe Pro Val Cys Ser Ser Leu Ser Glu Ser
 515 520 525

Val Ala Ala Ser Leu Gly Met Leu Asn Ala Ile Arg Asn His Ser Pro
 530 535 540

Phe Ser Leu Ser Asn Phe Lys Leu Leu Ser Ile Gln Glu Met Leu Leu
 545 550 555 560

Cys Lys Asp Val Gly Asp Met Leu Ala Tyr Arg Glu Gln Leu Phe Leu
 565 570 575

Glu Ile Ser Ser Lys Arg Lys Gln Ser Asp Ser Glu Lys Ser
 580 585 590

国際様式 INTERNATIONAL FORM

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

原寄託についての受託証

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 協和醗酵工業株式会社
取締役社長 平田 正 殿
寄託者 あて名 〒 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 2-46-1	(受託番号) FERM BP- 7755
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 13 年 9 月 26 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organisation 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 小松 泰 Dr. Yasubiko Komatsu	
あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan	
平成 13 年 (2001) 9 月 26 日	

国際様式

INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 協和醗酵工業株式会社
取締役社長 平田 正 殿
寄託者 あ て 名 〒 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Nega-13	(受託番号) FERM BP- 7756
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 13 年 9 月 26 日 (原寄託日) に受領した 1 種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 種の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター International Patent Organisation 名 称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology センター長 小松 康子 Dr. Yasubiko Komatsu あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) AIST Tsukuba Central 6.1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan 平成 13 年 (2001) 9 月 26 日	

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

152 頁、 26-28 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7755
----------------------------	----------------------

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている ☐

オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、
本願に関し、ブタベスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 19 OCT 2001
権限のある職員 [署名]

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

152 頁、 26-28 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6（郵便番号305-8566）

寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7755
----------------------------	----------------------

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている ☐

カナダ特許法サブセクション104(4)及び
同特許法規則160(4)の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 <div style="text-align: center; font-family: cursive;">金井 信也</div>
様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 19 OCT 2001
権限のある職員 <div style="text-align: center; font-family: cursive;">田中 正史</div>

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
156 頁、	20-22 行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成13年（2001）9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合） EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 19 2001
権限のある職員 水田 孝史

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

156 頁、 20-22 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7756
----------------------------	----------------------

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている ☐

オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、
本願に関し、ブタベスト条約に従って寄託された物質の試料は、
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

金井 信也

国際事務局記入欄

☐ この用紙が国際事務局に受理された日

15 10

権限のある職員

井口 正史

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
156 頁、	20-22 行
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名(郵便番号及び国名を含む) 日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)	
寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示(該当しない場合には記載しない) この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国(すべての指定国のために行わない場合)	
CA	
E. 追加事項の表示の届出(該当しない場合には記載しない)	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 金井 信也

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 15
権限のある職員 井口 正史

出願人又は代理人の書類記号 P-38524	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

152 頁、 26-28 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付 平成13年(2001) 9月26日	受託番号 FERM BP-7755
----------------------------	----------------------

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

EP

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄	
<input checked="" type="checkbox"/>	この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員	金井 信也

国際事務局記入欄	
<input type="checkbox"/>	この用紙が国際事務局に受理された日
権限のある職員	建 田 信也

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12P21/08, C07K16/00, A01K67/00, A61K39/395, C12N9/00,
C12N15/52, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12P21/08, C07K16/00, A01K67/00, A61K39/395, C12N9/00,
C12N15/52, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PIR/Swissprot/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, Journal of Immunological Methods, 1994, Vol.167, pp.271-278	41, 54-56 1-40, 42-53, 57-61
Y A	Furukawa Kiyoshi, Seitai ni okeru Totanpakushitsu Tousei no Kinou Kaiseki, Tanpakushitau Kakusan Kouso, 1998, Vol.43, No.16, pp.2309-2317	23-36, 42-50 1-22, 37-41, 51-61
Y A	US 5728568 A (Genetic Institute Inc.), 17 May, 1998 (17.05.1998) (Family: none)	23-36, 42-50, 57-61 1-22, 37-41, 51-56
Y A	WO 99/64618 A1 (DCV Inc.), 16 December, 1999 (16.12.1999) & EP 1084267 A1 & AU 9942051 A	23-36, 42-50, 57-61 1-22, 37-41, 51-56
Y A	WO 97/37683 A1 (CYTEL CORPORATION), 16 October, 1997 (16.10.1997) & EP 904101 A1	23-36, 42-50, 57-61 1-22, 37-41, 51-56

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 January, 2002 (11.01.02)	Date of mailing of the international search report 02 January, 2002 (02.01.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08804

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/27303 A1 (Toyobo Co., Ltd.), 31 July, 1997 (31.07.1997)	23-36, 42-50, 57-61
A	& JP 9-201191 A & EP 816503 A1 & JP 10-4959 A & JP 10-84975 A & US 6054304 A & US 6291219 A	1-22, 37-41, 51-56
PX	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD.), 19 October, 2000 (19.10.2000)	1-56
PA	& AU 200036728 A	57-61
A	WO 99/54342 A1 (UMANA Pablo), 28 October, 1999 (28.10.1999) & EP 1071700 A1 & AU 9936578 A	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08804

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.


Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims 1 to 56 relate to increasing the ratio of N-linkage complex sugar chains which are free from fucose bonded to N-acetylglucosamine at the sugar chain reducing end. The inventions as set forth in claims 57 to 61 relate to enzymes participating in sugar chain synthesis. These enzymes are not directly employed in the inventions as set forth in claims 1 to 56.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 56 do not have technical relevancy to the inventions as set forth in claims 57 to 61 in the meaning as defined in PCR Rule 13.2. Thus, these inventions are not considered as complying with the requirement of unity of invention.

Concerning the inventions as set forth in claims 57 to 61, they involve five inventions relating to enzymes GMD, Fx, GFPP and two α -fucosyltransferases.

Since enzymes having these activities had been already known, there is no technical relevancy in the meaning as defined in PCR Rule 13.2 among the inventions relating to these five enzymes. Thus, they are not considered as complying with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ¹ C12N5/10, C12P21/08, C07K16/00, A01K67/00, A61K39/395, C12N9/00, C12N15/52, G01N33/53		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ¹ C12N5/10, C12P21/08, C07K16/00, A01K67/00, A61K39/395, C12N9/00, C12N15/52, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq PIR/Swissprot/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, Journal of Immunological Methods, 1994, Vol. 167, p. 271-278	41, 54-56 1-40, 42-53, 57-61
<u>Y</u> A	古川清, 生体における糖蛋白質糖鎖の機能解析, 蛋白質核酸酵素, 1998, Vol. 43, No. 16, p. 2309-2317	23-36, 42-50 1-22, 37-41, 51-61
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">11. 01. 02</div>	国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">22.01.02</div>	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 <div style="text-align: right;">  </div>	
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		4 B 9 5 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y — A	US 5728568 A (Genetic Institute Inc.) 1998.05.17 (ファミリーなし)	23-36, 42- <u>50, 57-61</u> 1-22, 37-41, 51-56
Y — A	WO 99/64618 A1 (DCV Inc.) 1999.12.16 & EP 1084267 A1 & AU 9942051 A	23-36, 42- <u>50, 57-61</u> 1-22, 37-41, 51-56
Y — A	WO 97/37683 A1 (CYTEL CORPORATION) 1997.10.16 & EP 904101 A1	23-36, 42- <u>50, 57-61</u> 1-22, 37-41, 51-56
Y — A	WO 97/27303 A1 (東洋紡績株式会社) 1997.07.31 & JP 9-201191 A & EP 816503 A1 & JP 10-4959 A & JP 10-84975 A & US 6054304 A & US 6291219 A	23-36, 42- <u>50, 57-61</u> 1-22, 37-41, 51-56
<u>P X</u> P A	WO 00/61739 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2000.10.19 & AU 200036728 A	<u>1-56</u> 57-61
A	WO 99/54342 A1 (UMANA Pablo) 1999.10.28 & EP 1071700 A1 & AU 9936578 A	1-61

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-56に係る発明は、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないN-結合複合型糖鎖の割合を増加させることに関するものである。請求項57-61に係る発明は、糖鎖合成に関与する酵素に関するものであり、これらの酵素は請求項1-56に係る発明において直接用いられるものではない。
したがって、請求項1-56、57-61に係るそれぞれの発明の間にPCT規則13.2の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。
また請求項57-61に係る発明についてみると、これらはGMD、Fx、GFPP、2種類の α -1,6-フコシルトランスフェラーゼという酵素に関する5つの発明を含んでいる。
(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

これらの活性を有する酵素は既に知られていることから、この5つの酵素に係るそれぞれの発明の間には、PCT規則13.2の意味における技術的な関係はなく、発明の単一性の要件は満たされていない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.